



**Universidade de  
Aveiro  
2012**

Departamento de Química

**Ana Filipa Ligeiro de  
Jesus**

**Erros de tradução no mRNA e instabilidade  
genómica**

**mRNA mistranslation and genomic instability**



**Ana Filipa Ligeiro de  
Jesus**

**Erros de tradução no mRNA e instabilidade  
genómica**

**mRNA mistranslation and genomic instability**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Doutora Gabriela Maria Ferreira Ribeiro de Moura, Equiparada a Investigadora Auxiliar da Universidade de Aveiro e co-orientação do Doutor Manuel António da Silva Santos, Professor Associado da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo apoio incondicional ao longo da minha vida e formação académica.

## **o júri**

presidente

Doutor António Carlos Matias Correia  
Professor Catedrático, Universidade de Aveiro

Doutora Gabriela Maria Ribeiro de Moura  
Equiparada a Investigadora Auxiliar, Universidade de Aveiro

Doutor Manuel António da Silva Santos  
Professor associado, Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Vitor Manuel Vieira da Costa  
Professor associado, Universidade do Porto

## **agradecimentos**

Este meu singelo agradecimento tem de ir, em primeiro lugar, para a Laura que foi não só fonte de orientação, como companheira de trabalho e presença constante e amigável ao longo de todo o trabalho experimental. Quero agradecer ainda ao professor Manuel, pelo apoio e a crítica construtiva que ofereceu durante toda a realização do trabalho.

Aos meus pais que sempre tentaram construir comigo um futuro risonho e estável, que me educaram, aconselharam, apoiaram e investiram em mim, mesmo que não entendessem por completo as minhas escolhas.

Aos meus companheiros de laboratório que sempre me ajudaram e que até cederam a bancada, quando não a tinha. Um especial agradecimento à Sofia, à Rita e à Joana: a vossa companhia e ajuda foram indispensáveis e tornaram todo o processo bastante mais simples.

Por fim aos meus amigos, a minha família de coração, que me apoiaram incondicionalmente, que me ouviram sempre, ainda que eu estivesse a falar chinês (ou algo semelhante), e que me deram forças para continuar e nunca desistir. Eles foram fonte de motivação para sempre a dar o meu melhor.

A eles todos, o meu mais sincero obrigada. Tenho a certeza que sem o vosso apoio não chegaria a esta meta do mesmo modo.

## palavras-chave

*Saccharomyces cerevisiae*, erros de tradução, tRNA ambíguo, resposta ao *stress*, ROS, alteração de ploidia, expressão genética, instabilidade genómica.

## Resumo

Um conhecimento alargado sobre o impacto de erros de tradução do mRNA pode ajudar a compreender a biologia do *stress* proteotóxico. A inserção de um tRNA ambíguo (tRNA<sub>CAG</sub><sup>Ser</sup>) em *Saccharomyces cerevisiae* permitiu obter um sistema celular modelo para o estudo do impacto de uma elevada taxa de erro de tradução em células eucarióticas. Estes erros estão associados à acumulação de proteínas agregadas que destabilizam a homeostase celular.

Neste trabalho estudaram-se 6 estirpes diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*, submetendo-as a diferentes tipos de *stress* externos e testando vários parâmetros celulares, nomeadamente: o nível de ROS intracelular, alterações de ploidia e expressão genética. Estes erros não conferiram aumento de resistência a *stresses* ambientais e verificou-se que em geral provocaram aumento de *stress* oxidativo. A nível da ploidia foram registadas alterações, apresentando-se o estado diplóide como o mais estável nestas estirpes. No que toca ao estudo expressão genética, conseguiu-se encontrar uma resposta comum entre estirpes.

Com este trabalho surgiram novas questões sobre o impacto dos erros da síntese proteica na célula, sendo necessários mais testes para caracterizar a resposta ao *stress* proteotóxico induzido por erros de tradução.

**keywords**

*Saccharomyces cerevisiae*, mistranslation, ambiguous tRNA, stress response, ROS, ploidy alterations, genetic expression, genomic instability.

**abstract**

The study of mRNA mistranslation may is likely to contribute to elucidate the biology of the proteotoxic stress. The insertion of an ambiguous tRNA (tRNA<sub>CAG</sub><sup>Ser</sup>) in *Saccharomyces cerevisiae* produced a model system for studying the impact of proteic synthesis errors in eukaryotic cells.

In this work, we have studied 6 different strains of *Saccharomyces cerevisiae*, by subjecting them to several stressors and testing several cellular parameters, namely: intracellular ROS, ploidy changes and gene expression. Mistranslation did not confer an increased resistance to environmental stresses but an increase in oxidative stress was common to all strains. Mistranslation increased ploidy turning N to 2N with the production of aneuploidy cells. The genomic effects of mistranslation were similar to all strains.

New questions have arisen about the impact of mistranslation on the cell and additional studies are required to fully characterize the stress response induced by mistranslation.

# Índice

<i>Índice de Figuras</i> .....	III
<i>Lista de tabelas</i> .....	IV
1 Introdução e objectivos do trabalho.....	7
1.1 O genoma .....	9
1.2 O código genético .....	11
1.3 RNA de transferência .....	13
1.4 Tradução em eucariotas.....	18
1.5 Biologia dos erros de tradução.....	21
1.6 A levedura como modelo de estudo dos erros da síntese proteica .....	24
1.7 Objectivos do Trabalho .....	32
1.7.1 Testes fenotípicos .....	32
1.7.2 Estudo da expressão genética .....	33
2 Material e métodos .....	35
2.1 Obtenção e conservação de estirpes .....	36
2.2 Testes fenotípicos .....	36
2.3 Protocolos de citometria.....	38
2.3.1 Medição de ROS .....	38
2.3.2 Monitorização de ploidia .....	38
2.4 Protocolo de Microscopia (marcação do DNA com DAPI) .....	39
2.5 Protocolo de transformação de <i>S. cerevisiae</i> .....	39
2.6 Extracção e preparação do RNA para análise de aCGH.....	40
2.6.1 Isolamento de RNA total de <i>S. cerevisiae</i> .....	40
2.6.2 Transcrição reversa do RNA .....	41
2.6.3 Marcação fluorescente de cDNA .....	42
2.7 Protocolo de hibridação para Arrays de Expressão Genética .....	43



2.7.1	Pré-hibridação.....	43
2.7.2	Hibridação .....	43
2.7.3	Lavagem dos <i>arrays</i> hibridados.....	43
2.7.4	Aquisição de imagem e processamento dos dados .....	44
2.7.5	Análise estatística e enriquecimento funcional dos dados.....	44
3	Resultados .....	47
3.1	Nota introdutória .....	48
3.2	Testes fenotípicos .....	48
3.3	Monitorização do ROS intracelular .....	49
3.4	Ploidia .....	50
3.5	<i>Arrays</i> de expressão genética .....	52
4	Discussão de resultados .....	59
5	Conclusão e perspectivas futuras.....	65
6	Bibliografia .....	67

## *Índice de Figuras*

<b>Figura 1</b> - Estrutura de um nucleótido .....	9
<b>Figura 2</b> - Estrutura do DNA.....	10
<b>Figura 3</b> - Código genético universal.....	12
<b>Figura 4</b> - Estruturas do tRNA .....	13
<b>Figura 5</b> - Estrutura terciária do tRNA .....	14
<b>Figura 6</b> - Esquema que ilustra a <i>wobble hypothesis</i> , avançada por Crick .....	15
<b>Figura 7</b> - Mecanismo do controlo de qualidade durante a aminoacilação do tRNA <sup>17</sup>	
<b>Figura 8</b> - Esquema representativo da estrutura do ribossoma .....	19
<b>Figura 9</b> - Mecanismo de alongamento da tradução em eucariotas .....	20
<b>Figura 10</b> - Perda de células de Purkinje no cerebelo de ratinhos. ....	22
<b>Figura 11</b> - Condições ambientais que diminuem a aptidão de células defeituosas para realizarem o controlo de qualidade.....	23
<b>Figura 12</b> - Estrutura do tRNA <sub>CAG</sub> <sup>Ser</sup> de <i>Candida albicans</i> .....	24
<b>Figura 13</b> - Análise de citometria de fluxo com marcação de DNA com SybrGreen I .....	26
<b>Figura 14</b> - Mapa de alterações do número de cópias de genes em leveduras sujeita a elevada taxa de erros de tradução.....	27
<b>Figura 15</b> - Mapa de alterações do número de cópias de genes em leveduras sujeita a elevada taxa de erros de tradução.....	28
<b>Figura 16</b> - Esquema representativo da alteração do número de cópias dos genes de observadas num segmento cromossoma XII em várias estirpes onde se induziu uma elevada taxa de erros de tradução por introdução do tRNA <sub>CAG</sub> <sup>Ser</sup> .....	31
<b>Figura 17</b> - Esquema representativo da alteração do número de cópias dos genes de observadas no DNA mitocondrial em várias estirpes onde se induziu uma elevada taxa de erros de tradução por introdução do tRNA <sub>CAG</sub> <sup>Ser</sup> .....	32
<b>Figura 18</b> - Comparação da resposta das estirpes em estudo aos vários stresses a que foram sujeitos. ....	48
<b>Figura 19</b> - Comparação dos níveis de <i>stress</i> oxidativo entre várias estirpes de levedura.....	50
<b>Figura 20</b> - Análise de citometria de fluxo com marcação do DNA com iodeto de propídeo .....	51
<b>Figura 21</b> - Os erros de tradução não alteram a morfologia nuclear da levedura. ....	52
<b>Figura 22</b> - Agrupamento hierárquico: correlação de Pearson.....	53
<b>Figura 23</b> - Genes cuja expressão foi induzida pelos erros de tradução em todas as estirpes excepto a CEN-M2 e nos mutantes da estirpe Y .....	56
<b>Figura 24</b> - Genes cuja expressão foi reprimida pelos erros de tradução em todas as estirpes excepto no CEN-M2 e nos mutantes da estirpe Y.....	57

## ***Lista de tabelas***

<b>Tabela 1</b> - Estirpes de levedura <i>S. cerevisiae</i> investigadas no âmbito de estudos de hibridação comparativa de genomas em <i>microarrays</i> de DNA (aCGH) para caracterização de padrões de instabilidade genómica causada por elevada taxa de erros de tradução .....	29
<b>Tabela 2</b> - Resumo das alterações de número de cópias de genes observadas por hibridação comparativa do genoma de leveduras sujeitas a elevada taxa de erros de tradução relativamente ao controlo .....	30
<b>Tabela 3</b> - Estirpes usadas e designação dos vários clones .....	36
<b>Tabela 4</b> - Lista de compostos utilizados nos testes fenotípicos e respectivas concentrações .....	37
<b>Tabela 5</b> - Genes cuja expressão foi induzida em resposta aos erros de tradução em todas as estirpes estudadas.....	54
<b>Tabela 6</b> - Genes cuja expressão foi reprimida em resposta aos erros de tradução nas estirpes estudadas.....	55

## ***Lista de abreviaturas***

A	Adenina
aaRSs	Aminoacil-tRNA sintetases
aCGH	Array de hibridação comparativa de genomas (abreviado do inglês <i>Comparative Genome Hybridation Array</i> )
AlaRS	alanil-tRNA-sintase (abreviado do inglês <i>alanine tRNA-synthetase</i> )
B42	BY4742
B43	BY4743
C	Citosina
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CdCl <sub>2</sub>	Cloreto de cádmio
CEN	CEN.PK2
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHR 123	dihidrorodamina 123
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DTT	Ditiotreitol
eIFs	factores de iniciação eucarióticos (abreviado do Inglês <i>eukaryotic initiation factors</i> )
ERAD	Degradação de proteínas associadas ao retículo endoplasmático (abreviado do Inglês <i>Endoplasmatic Reticulum Associated Protein</i> )
ESR	Environmental <i>Stress</i> Response
G	Guanina
GTP	Guanina trisfosfato (abreviado do Inglês <i>guanosine trisphosphate</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
IleRS	Isoleucina-tRNA sintetase
J	J940047
LeuRS	Leucinil-tRNA sintetase
Leu-tRNA <sub>CAG</sub> <sup>Ser</sup>	tRNA de serina aminoaciliado com leucina
LiCl	Cloreto de Lítio
mRNA	RNA mensageiro (abreviado do inglês <i>messenger RNA</i> )

mtDNA	DNA mitocondrial
NaCl	Cloreto de Sódio
PheRS	fenilalanil-tRNA sintetase (abreviado do inglês <i>phenylalanine tRNA-synthetase</i> )
PI	iodeto de propídeo (abreviado do inglês <i>propidium iodide</i> )
RF	Release factor
RNA	ácido ribonucleico (abreviado do inglês <i>ribonucleic acid</i> )
ROS	Espécies reactivas de oxigénio (abreviado do inglês <i>reactive oxygen species</i> )
rRNA	RNA ribossomal (abreviado do Inglês <i>ribosomal RNA</i> )
S	S228c
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio (abreviado do Inglês <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
SerRS	Serilil-tRNA sintetase
Ser-tRNA <sub>CAG</sub> <sup>Ser</sup>	tRNA de serina aminoaciliado com serina
SGD	Saccharomyces Genome Database
T	Timina
Thr	treonina (abreviado do inglês Threonine)
tRNA	RNA de transferência (abreviado do Inglês <i>transfer RNA</i> )
tRNA <sub>CAG</sub> <sup>Ser</sup>	tRNA de serina com anticodão CAG
Tyr-tRNA <sup>Phe</sup>	tRNA de fenilalanina aminoaciliado com tirosina
U	Uracilo
UPR	Resposta à acumulação d proteínas com estruturas aberrantes (abreviado do Inglês <i>unfolded protein response</i> )
ValRS	Valinil-tRNA sintetase
Y	YJM789

## **1 Introdução e objectivos do trabalho**

*Science, in the every act of solving problems, create more of them.*

Abraham Flexner

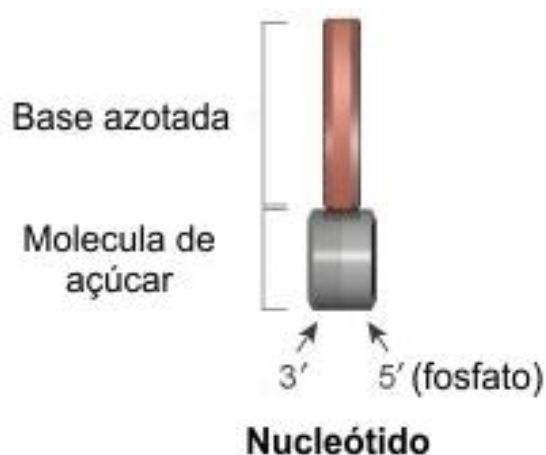
## 1.1 O genoma

Os avanços que têm sido feitos nos últimos anos nas áreas da Biologia Molecular e da Genética trouxeram à sociedade actual não só uma maior compreensão dos organismos vivos mas também inúmeras novas perguntas. Para essas mesmas questões, tenta-se todos os dias encontrar uma nova resposta que pode trazer mil e uma novas dúvidas.

A descoberta da estrutura em dupla hélice do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *Deoxyribonucleic acid*), por James Watson e Francis Crick, em meados do século XX, foi como que um despoletar para novas descobertas, nomeadamente nos processos que se relacionam com a forma como a informação necessária para manter e replicar uma célula passa à descendência. O DNA é uma molécula complexa, que contém a informação genética determinante para o fenótipo do organismo onde esta está contida. É possível encontrar esta molécula em praticamente todas as células vivas,

estando localizada, nos eucariotas, dentro do núcleo (constituindo o DNA nuclear) ou em organelos celulares destes organismos, como na mitocôndria (DNA mitocondrial ou mtDNA) e nos cloroplastos. Podemos distinguir na sua constituição química uma sequência ordenada de nucleótidos, cada um deles formado por três componentes primários (Figura 1): uma base azotada (uma purina ou uma pirimidina), um grupo fosfato e uma molécula de açúcar (desoxirribose).

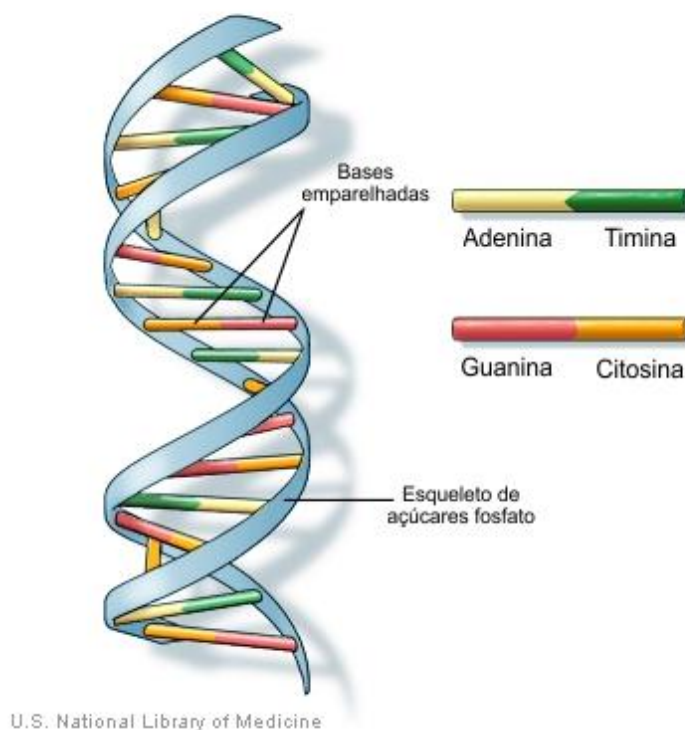
No DNA, existem 4 nucleótidos diferentes, cada um definido por uma base azotada específica: adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C). Embora o DNA seja identificado diversas vezes como um polinucleótido de cadeia simples, a sua conformação mais estável apresenta-se quando forma cadeia dupla.<sup>1</sup> A forma de dupla hélice é determinada pelas pontes de hidrogénio formadas entre os



**Figura 1 | Estrutura de um nucleótido.** Um nucleótido contém uma base azotada (a vermelho), uma molécula de açúcar – desoxirribose (a cinzento) e um grupo fosfato ligado ao lado 5' do açúcar (indicado pelo cinzento claro). (adaptado de *Essentials of Genetic*<sup>1</sup>)



pares de bases azotadas e as ligações entre o grupo açúcar e fosfato de cada nucleótido (Figura 2).<sup>2</sup>



**Figura 2 | Estrutura do DNA.** O DNA representado em estrutura de hélice dupla formada por pares de bases ligadas a uma estrutura açúcar-fosfato. (adaptado de *U.S. National Library of Medicine*).

A informação genética necessária para sintetizar proteínas está contida na sequência de DNA em regiões codificantes designadas como genes. Estes são transcritos para uma sequência de RNA (ácido ribonucleico, abreviado do Inglês *ribonucleic acid*), um outro tipo de ácido nucleico que difere do DNA pela presença de um grupo de açúcar ribose no lugar da desoxirribose. De salientar que este ácido ribonucleico não contém a base azotada timina, sendo esta substituída por um uracilo (U) que interage com a adenosina. A transcrição é um processo catalisado enzimaticamente que ocorre no núcleo de células eucariotas. Vulgarmente, o RNA recebe a designação de RNA mensageiro (mRNA, do inglês *Messenger RNA*), pois transporta a informação do núcleo para o citoplasma onde será traduzida numa sequência de aminoácidos por complexos moleculares específicos.

Cada cromossoma é constituído por diversos genes que contêm a informação para as mais distintas proteínas. Aqui podemos distinguir moléculas como as

DNA polimerases, que catalisam a polimerização de nucleótidos para a formação da cadeia complementar de DNA, sendo essenciais não só na duplicação de DNA, como na manutenção da vida.<sup>3</sup>

No primeiro passo, a informação presente no DNA é transferida para um mensageiro (mRNA), sendo os diversos genes transcritos para RNA mediante o emparelhamento de bases complementares entre a cadeia molde de DNA e a cadeia de RNA nascente, sintetizada por uma polimerase de RNA. O mRNA resultante é uma cópia de cadeia simples do gene, que necessita, então, de ser traduzido numa sequência de aminoácidos de uma proteína. Surge então o segundo passo: a tradução. Esta ocorre em todas as células, em estruturas macromoleculares denominadas de ribossomas, e garante que a informação presente na molécula de mRNA seja convertida em aminoácidos, que darão origem à proteína final.<sup>4</sup>

## 1.2 O código genético

O termo código genético refere-se à tradução da informação contida no DNA em informação proteica, que utiliza tripletos de nucleótidos na sequência do mRNA, designados de codões, que são decodificados no ribossoma numa sequência de aminoácidos específica. As 4 bases azotadas diferentes permitem codificar os 20 aminoácidos essenciais, através de diferentes combinações de bases azotadas em sequências de tripletos (Figura 3).

Desde o início que se sabia que o código genético teria de ser mais complexo do que apenas um nucleótido por aminoácido; mesmo 2 nucleótidos por aminoácido não conseguiriam originar 20 aminoácidos, mas sim 16. Deste modo, rapidamente se concluiu que a menor combinação possível para originar os 20 aminoácidos essenciais seria a de 3 nucleótidos por aminoácido.<sup>5</sup>

Este resultado levantou outras questões, pois a combinação de 4 nucleótidos em tripletos permite 64 combinações diferentes ( $4^3=64$ ), inferindo-se sobre a existência de mais do que um codão para o mesmo aminoácido. Destes 64 codões, 3 são codões *STOP* que determinam o fim da sequência traduzida (UAA, UAG e UGA), um deles funciona como codão de iniciação da tradução (AUG), que

codifica metionina, e os restantes codificam os aminoácidos restantes do código genético.<sup>5</sup>

		Segundo nucleótido					
		U	C	A	G		
Primeiro nucleótido	U	UUU Phe	UCU	UAU Tyr	UGU Cys	Terceiro nucleótido	U
		UUC	UCC Ser	UAC	UGC		C
		UUA Leu	UCA	UAA STOP	UGA STOP		A
		UUG	UCG	UAG STOP	UGG Trp		G
	C	CUU	CCU	CAU His	CGU		U
		CUC Leu	CCC Pro	CAC	CGC Arg		C
		CUA	CCA	CAA Gln	CGA		A
		CUG	CCG	CAG	CGG		G
	A	AUU	ACU	AAU Asn	AGU Ser		U
		AUC Ile	ACC Thr	AAC	AGC		C
		AUA	ACA	AAA Lys	AGA Arg		A
		AUG Met	ACG	AAG	AGG		G
	G	GUU	GCU	GAU Asp	GGU		U
		GUC Val	GCC Ala	GAC	GGC Gly		C
		GUA	GCA	GAA Glu	GGA		A
		GUG	GCG	GAG	GGG		G

**Figura 3 | Código genético universal.** O código genético é formado por diferentes combinações dos 4 nucleótidos em tripletos, ou codões, que correspondem a diferentes aminoácidos durante a tradução da sequência nucleotídica do mRNA em sequências de aminoácidos das proteínas. Este código é degenerado, ou seja existe mais do que um codão para o mesmo aminoácido, mas não é ambíguo na medida em que cada codão só codifica um único aminoácido. De salientar a existência de um único codão de iniciação, AUG (a azul) e três codões stop, UAA, UAG e UGA (a vermelho). (adaptado de *Reading the Genetic Code*<sup>7</sup>)

Ao contrário do que se julgou durante muito tempo, o código genético não é universal e nos últimos 30 anos têm-se descoberto diversas alterações, tanto em bactérias como em diversas espécies eucarióticas. Na maioria das leveduras, o codão de terminação mitocondrial UGA é descodificado como triptofano e a família de codões de leucina CUN, em que o N representa qualquer tipo de base azotada codifica treonina na mitocôndria de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida glabrata*. Em bactérias, as alterações ao código genético usualmente envolvem a redefinição de codões *nonsense* (STOP), mas também de codões *sense*, como por



complementares. No topo do diagrama da Figura 4 identifica-se o braço aceitador de aminoácidos, que inclui os dois terminais do tRNA que estão emparelhados entre si (o terminal 3' contém a sequência não variável CCA e projecta-se para além do terminal 5'). O braço D (*dihydrouracil loop*) é denominado assim devido à presença de bases modificadas de uracilo presentes nesta zona. O braço T (*T loop*) recebe o seu nome de uma sequência praticamente invariável de três bases azotadas: T $\psi$ C ( $\psi$  é a pseudo-uridina, um nucleósido modificado no tRNA que difere da uridina na ligação à ribose). Por fim, o braço do anticodão (*anticodon loop*) contém um anticodão - a sequência de 3 bases que emparelha com um codão de mRNA, permitindo, assim, a descodificação do mRNA. A região entre o braço do anticodão e o braço T é denominada de braço variável (*variable loop*) uma vez que varia no seu comprimento, de 4 a 13 nucleótidos.<sup>2,7,8</sup>

Os tRNA também partilham uma forma tridimensional comum, que se parece com a letra L invertida (Figura 5). Esta forma maximiza a estabilidade da molécula alinhando os pares de bases presentes na região braço D com as bases presentes na região do braço do anticodão. O anticodão do tRNA projecta-se a partir da lateral do braço do anticodão e é colocado numa posição onde rapidamente emparelha com o respectivo codão no mRNA, quando localizado na subunidade maior do ribossoma, onde ocorre o processo de tradução.<sup>2</sup>

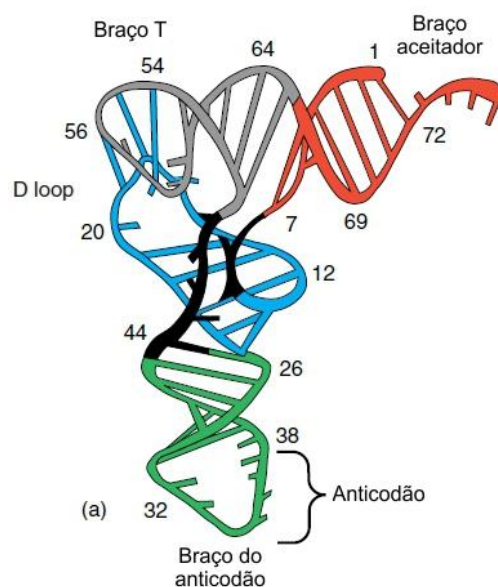
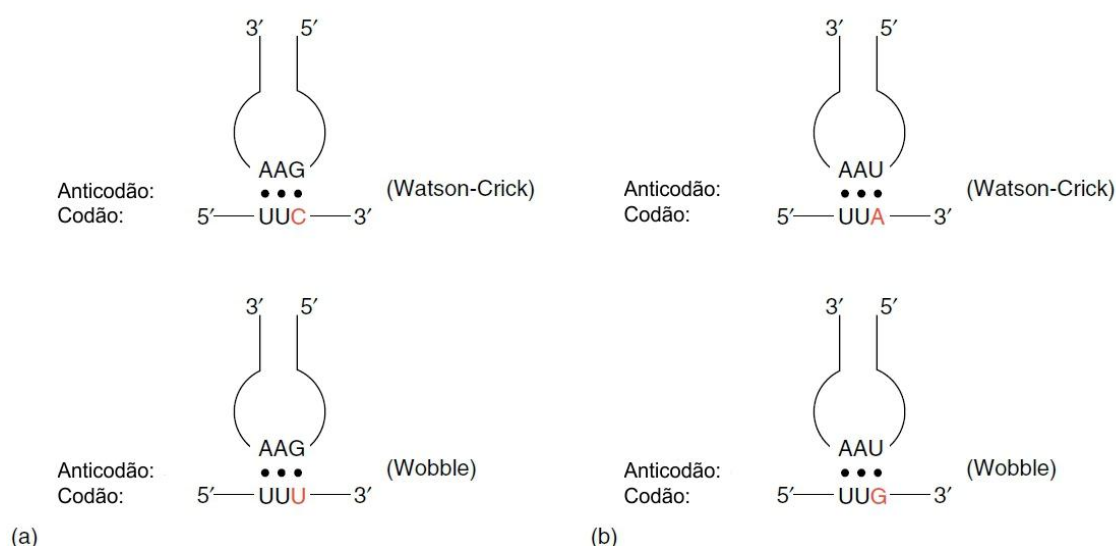


Figura 5 | Estrutura terciária do tRNA.

Para que um dado tRNA desempenhe a sua função no processo de tradução, é necessário que um aminoácido se ligue especificamente ao tRNA com o anticodão correspondente, originando-se assim um aminoacil-tRNA. É aqui que as aminoacil-tRNA sintetases desempenham o seu papel. Estas enzimas carregam o tRNA com o aminoácido adequado, permitindo assim uma tradução correcta do código de bases do DNA para o código de aminoácidos das proteínas.<sup>9-11</sup> A maioria das células tem 20 aminoacil-tRNA sintetases diferentes, uma para cada

aminoácido. As suas diferenças são bastante significativas, estando cada uma destas enzimas optimizadas para funcionar com o seu próprio aminoácido e um conjunto de moléculas de tRNA que descodificam cada família de codões.

Verifica-se, contudo, que no genoma de eucariotas não existem sequências de tRNAs suficientes para que cada molécula destas descodifique um único codão. Surgiu então a “*wobble hypothesis*”, apresentada por Crick como solução para este problema. Esta teoria postula que as duas primeiras bases de um codão emparelharam correctamente com o anticodão presente no tRNA, podendo existir uma alteração da última base de modo a formar pares de bases menos estáveis com o anticodão. De acordo com esta teoria, o anticodão 3'-AAG-5' consegue descodificar tanto o codão UUU como o codão UUC, os dois codões para a fenilalanina (Figura 6a). Assim, segundo Crick, a base G na posição 5' do anticodão pode tanto formar um emparelhamento G-C normal (*Watson-Crick*), ou um emparelhamento menos estável, G-U (*Wobble*). O mesmo sucede com o anticodão 3'-AAU-5' que consegue descodificar os codões UUA e UUG para a leucina (Figura 6b). Este fenómeno reduz o número de tRNAs necessários para traduzir o código genético.<sup>2,12</sup>



**Figura 6 | Esquema que ilustra a *wobble hypothesis*, avançada por Crick. (a)** Um tRNA com o anticodão 3'-AAG-5' emparelha com dois codões diferentes que codificam para a fenilalanina: UCC e UUU. A posição *wobble* (a terceira base do codão) é diferenciada a vermelho. **(b)** Um tRNA com o anticodão AAU emparelha com dois codões diferentes que codificam para a leucina: UUA e UUG. O emparelhamento com o codão UUG requer um par “*wobble*” na terceira posição do codão. (adaptado de *Molecular Biology*<sup>2</sup>)

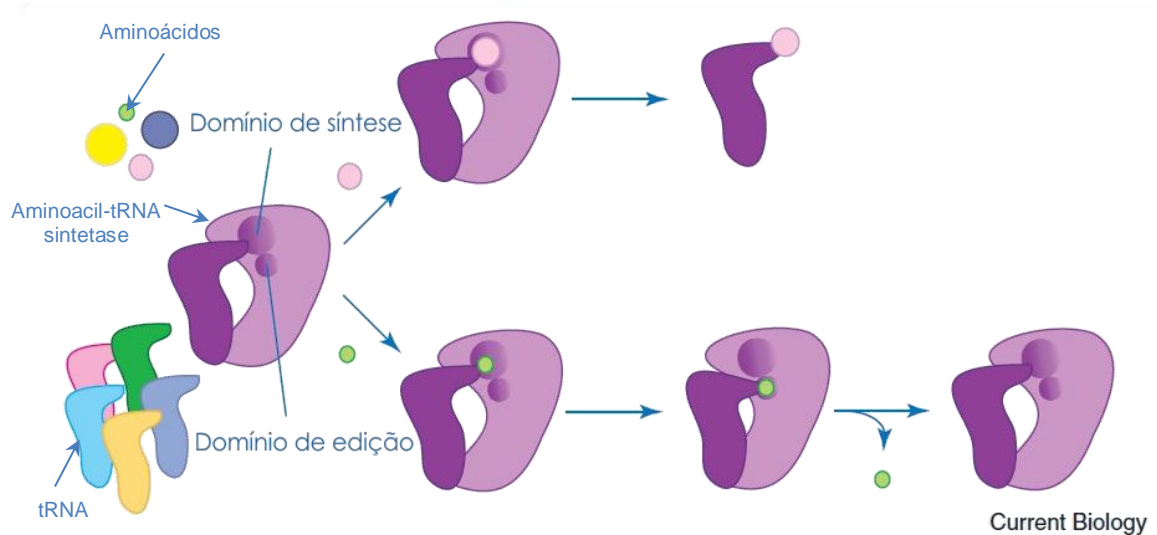
O processo de aminoacilação nem sempre ocorre correctamente; a selecção dos substratos apropriados (o tRNA e o aminoácido) pela correspondente aminoacil-tRNA sintetase revela-se, por vezes, complicada devido à estrutura muito semelhante de alguns aminoácidos. Estes são moléculas bastante pequenas e, embora apresentem diferenças químicas substanciais entre eles, alguns possuem propriedades químicas e/ou estruturais difíceis de distinguir pelas sintetases. Por exemplo, a treonil-tRNA sintetase tem de distinguir a treonina da molécula isostérica valina e da serina, que é mais pequena mas tem um grupo  $\gamma$ -hidroxil igual ao da treonina.<sup>2</sup>

Para mitigar problemas de aminoacilação existe controlo de qualidade durante a (Figura 7): 1) activação do aminoácido por adenilação e 2) transferência do aminoácido para o tRNA. No local activo são excluídos os aminoácidos que são maiores que o aminoácido correcto ou que não conseguem estabelecer interacções específicas suficientes, através de uma exclusão estérica, permitindo deste modo uma activação e transferência do aminoácido correcto. Os aminoácidos mais pequenos e com propriedades semelhantes ao aminoácido específico podem ser incorrectamente incorporados a frequências demasiado elevadas para manter a fidelidade do código genético. Para combater este problema, os aminoácidos passam por um segundo local activo (domínio de edição) onde as enzimas hidrolisam os aminoácidos activados incorrectamente ou a ligação dos aminoácidos a tRNAs incorrectos. O aminoácido correcto terá um aminoacil-AMP demasiado grande para este local, não sofrendo assim a hidrólise.<sup>7,10,13</sup>

Embora este mecanismo de edição da aminoacilação dos tRNAs diminua a taxa de erro em cerca de 10 vezes, o processo não é infalível e nalguns casos podem ocorrer erros que levam à incorporação do aminoácido errado nas proteínas sintetizadas. Para além disto, podem ocorrer mutações nas aminoacil-tRNA-sintetases que resultem numa redução da eficiência do controlo de qualidade, induzindo erros de tradução.

A aminoacilação incorrecta não é o único erro de tradução. De facto, existem também erros associados à leitura errada do mRNA. Estes erros dividem-se em *missense*, *nonsense* e *frameshifting*. Os erros *missense* induzem uma alteração genética, pois envolvem uma substituição de uma base azotada no mRNA por outra base, o que pode resultar na alteração do aminoácido introduzido no





**Figura 7 | Mecanismo do controlo de qualidade durante a aminoacilação do tRNA.** No domínio de síntese, o primeiro passo do mecanismo de controlo de qualidade, são excluídos os aminoácidos que são maiores que o aminoácido correcto ou que não conseguem estabelecer interações específicas suficientes, através de uma exclusão estérica. Já no domínio de edição, há a hidrólise de aminoácidos activados incorrectamente ou de ligações aos tRNAs em que ocorreu uma aminoacilação incorrecta. O aminoácido correcto terá um aminoacil-AMP demasiado grande para este local, não sofrendo a hidrólise. (adaptado de *Cellular mechanisms that control mistranslation*<sup>15)</sup>)

polipéptido nascente. Esta transformação não condiciona a leitura do código genético embora altere a informação contida na proteína.<sup>14</sup> Os *nonsense* resultam na paragem prematura da tradução e consequentemente, na síntese de uma proteína incompleta e muitas vezes não funcional. Este tipo de erro resulta na conversão de um codão que usualmente codifica para um aminoácido num codão stop (UGA, UAA e UGA) a meio da grelha de leitura.<sup>15</sup> Já no que toca a erros de *frameshifting*, estes envolvem a leitura da grelha -1 ou +1, relativamente à grelha correcta de leitura, o que resultará na síntese de proteínas completamente diferentes do que seria esperado se a leitura fosse feita na grelha zero<sup>16</sup>.

Erros de tradução são comuns em procariotas e eucariotas, sendo a sua frequência, em média, da ordem dos  $10^{-4}$ . No entanto, os sistemas de controlo de qualidade de proteínas minimizam o efeito tóxico das proteínas aberrantes. Podemos referir como exemplo dois tipos de mecanismos celulares que mitigam os efeitos da acumulação de proteínas aberrantes no retículo endoplasmático: 1) a *unfolded protein response*; 2) *Endoplasmatic Reticulum Associated Protein Degradation* (ERAD).<sup>17</sup> Na primeira verifica-se que a acumulação de proteínas desnaturadas no retículo endoplasmático activa uma resposta que regula a



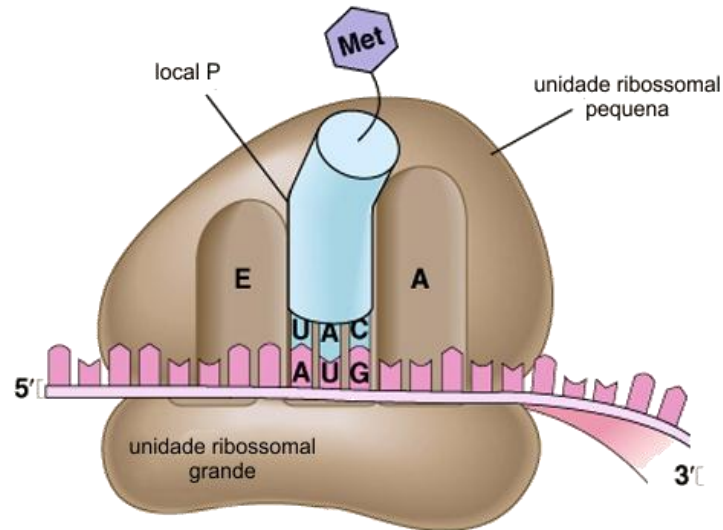
expressão génica, conferindo à célula capacidade de tolerância ao *stress* proteotóxico.<sup>18,19</sup> Quando o sistema ERAD é activado, há uma retro-translocação de proteínas aberrantes do retículo para o citosol onde são degradadas pelo sistema ubiquitina-proteosoma.<sup>20,21</sup>

Quando os mecanismos de controlo de qualidade não são suficientes para a eliminação de proteínas aberrantes, os erros de tradução poderão ter efeitos nefastos. Em organismos mais complexos podem revelar-se extremamente prejudiciais, uma vez que a alteração de uma única proteína pode condicionar grande parte do metabolismo do organismo.

## 1.4 Tradução em eucariotas

A tradução do código genético ocorre, tanto em procariotas como em eucariotas nos ribossomas. Este organelo é composto por 2 subunidades principais, compostas por rRNA (cerca de 60%) e outras proteínas ribossomais (cerca de 40%). O ribossoma eucariota tem uma subunidade maior, com um coeficiente de sedimentação de 60S e uma mais pequena, com coeficiente de sedimentação 40S.<sup>22</sup> Os ribossomas das células eucariotas são significativamente maiores do que os das células procariotas.<sup>22</sup> Estas moléculas encontram-se normalmente livres no citoplasma ou ligadas ao retículo endoplasmático<sup>23</sup>, nas mitocôndrias e os cloroplastos.

Cada ribossoma contém 4 locais de ligação a moléculas de RNA: um para o mRNA e três para tRNAs (Figura 8). O local A (*aminoacyl site*) liga o aminoacil-tRNA que transporta o aminoácido a ser adicionado na cadeia polipeptídica em crescimento. No local P (*peptidyl site*) liga-se o tRNA que contém o polipéptido em crescimento. No local E (*exit site*) localiza-se o tRNA já desacilado (sem aminoácido) que vai ser libertado do ribossoma. A especificidade da ligação dos tRNAs nestes locais é promovida pelos codões do mRNA presentes nestes locais de ligação. À medida que o ribossoma se move ao longo do mRNA na direcção 5'→3', a estabilidade da ligação dos tRNAs ligados a cada um destes locais (A, P e E) modifica-se conforme o codão presente no mRNA.<sup>24</sup> Esta característica permite uma leitura correcta do mRNA, adicionando o ribossoma cerca de dois aminoácidos por segundo à cadeia polipeptídica que está a ser sintetizada.<sup>25</sup>

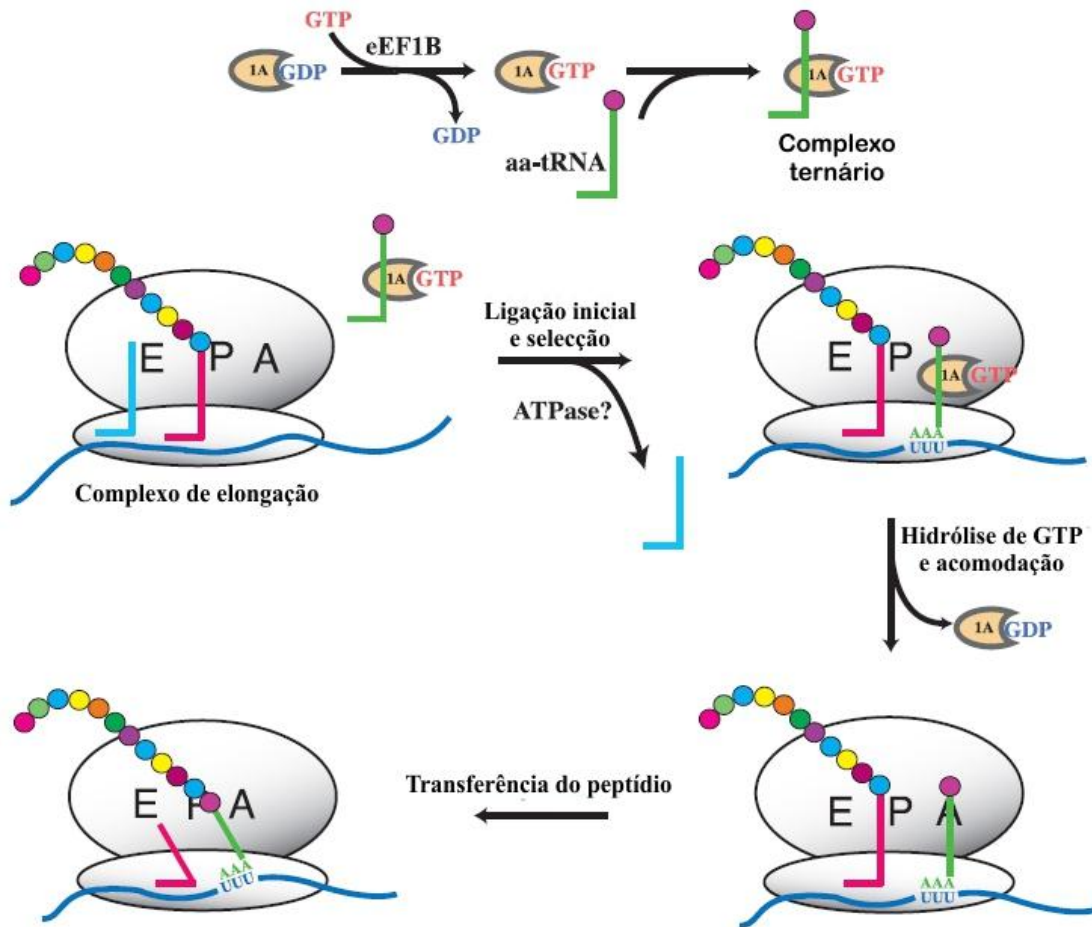


**Figura 8 | Esquema representativo da estrutura do ribossoma.**

Durante a fase de iniciação da tradução, em eucariotas, a unidade ribossomal pequena vai-se ligar ao terminal 5' do mRNA, percorrendo-o no sentido 5'→3' até encontrar o codão de iniciação (AUG), que codifica para metionina (Met). Nesse momento ocorrerá a ligação da subunidade maior formando o ribossoma cataliticamente competente (80S) e o tRNA de iniciação (Met-tRNA), que estará ligado ao local P da subunidade menor, emparelhará com o codão AUG, estimulando a maquinaria necessária à continuação do processo de tradução.

A tradução do mRNA pode-se dividir em três fases: iniciação, alongamento e terminação. Em eucariotas, o primeiro passo no mecanismo de iniciação é a montagem do complexo ternário eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub>, que se vai ligar à subunidade mais pequena (40S) do ribossoma, formando o complexo 43S. Este complexo é constituído por um factor de iniciação eIF2, que se liga ao GTP, um tRNA carregado com metionina (Met-tRNA) que irá reconhecer o codão AUG e diversas proteínas necessárias à tradução, nomeadamente, os factores de iniciação eucarióticos (eIFs).<sup>25</sup> A ligação do complexo é feita no terminal 5' do mRNA e este é percorrido no sentido 5'→3' até se encontrar um codão de iniciação (AUG) que esteja posicionado na sequência num contexto favorável. Tal promove o recrutamento da subunidade maior do ribossoma (60S), formando-se o ribossoma cataliticamente competente (80S). O tRNA de iniciação (Met-tRNA), presente no complexo ternário, emparelhará com o codão AUG, estimulando o recrutamento da maquinaria necessária para a continuação da tradução.<sup>11</sup>

O ciclo de alongamento (Figura 9) faz-se pela adição sucessiva de novos aminoácidos por tRNAs cuja ligação ao ribossoma depende do codão presente no local A do ribossoma. Este ciclo de síntese requer a participação de factores



**Figura 9 | Mecanismo de alongamento da tradução em eucariotas.** O complexo ternário (tRNA-GTP-EIF2) é responsável pelo recrutamento e transporte do tRNA que transporta o aminoácido. O novo codão localizado no local A do ribossoma dá continuidade ao processo de tradução que será alimentado com a energia resultante da hidrólise de GTP. A formação de uma ligação peptídica entre o novo aminoácido e o peptidil-tRNA localizado no local P permite o alongamento da cadeia polipeptídica nascente. Após esta reacção, existe uma transferência do tRNA desacilado para o local E (onde vai ser libertado do ribossoma) e do peptidil-tRNA que se deslocará para o local P. O mRNA vai ser então deslocado três nucleótidos de modo a que o codão seguinte possa ser lido e traduzido. (adaptado de *Molecular mechanisms of translational control*<sup>27</sup>)

específicos de alongação e GTP, que fornecerá a energia necessária para a formação da ligação peptídica entre aminoácidos. A formação desta ligação peptídica entre o novo aminoácido e o peptidil-tRNA é mediada pela peptidil transferase, uma enzima presente na subunidade maior do ribossoma, resultando na montagem de um dipéptido ligado ao tRNA no local A. O conjunto do dipéptido e tRNA presentes neste local denomina-se por dipeptidil-tRNA. De referir que este tRNA possui, neste momento, uma estrutura híbrida, tendo o seu braço aceitador ligado no local P do ribossoma e o seu braço do anticodão no local A da subunidade menor do ribossoma. Como tal, existe a necessidade do

complexo ser translocado, de modo a que o tRNA desacilado se mova por completo para o local E (onde se vai libertar do ribossoma), que o peptidil-tRNA se desloque novamente para o local P e que o mRNA se mova três nucleótidos de forma a que o próximo codão apareça no local A. Estas reacções são mediadas e catalisadas por proteínas presentes na subunidade menor do ribossoma.<sup>2,4,11</sup>

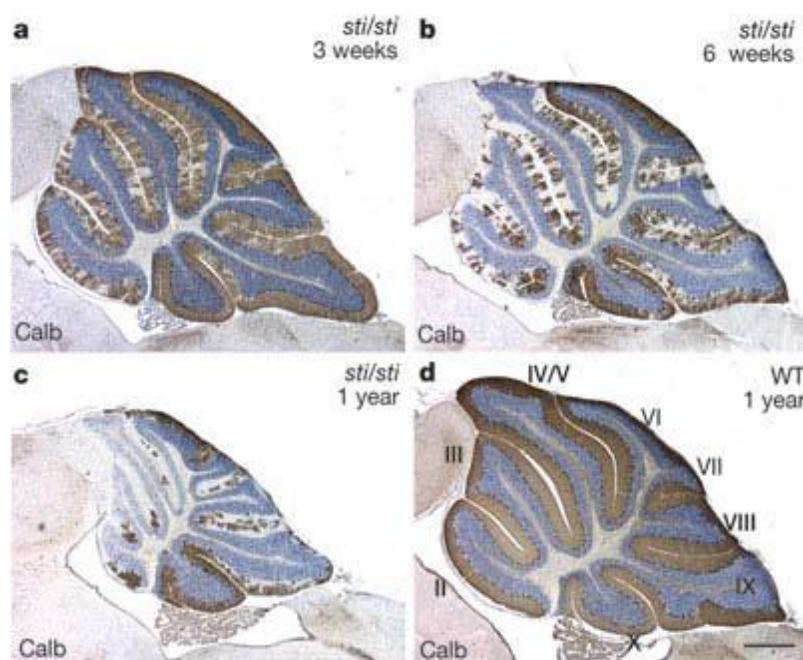
Os ciclos de alongamento vão-se então repetindo até o ribossoma reconhecer o codão STOP (UAA, UAG ou UGA). Surge então uma nova fase da tradução: a terminação. Esta pode ser vista de duas formas: ou como uma paragem por completo na síntese proteica mediada por um factor proteico que actua como *release factor* (RF), resultando na dissociação do ribossoma e na libertação de uma proteína sintetizada, ou como uma pausa nos sinais STOP, que por vezes têm como fim outros propósitos. A paragem da tradução envolve sinergias entre o ribossoma, do mRNA e os *release factors*. Estes ligam-se ao ribossoma quando aparece um codão STOP no local A do ribossoma, pois não existe nenhum tRNA capaz de reconhecer os codões STOP. O polipéptido é clivado do tRNA ligado ao local P por uma peptidil transferase.<sup>2,4,11</sup>

## 1.5 Biologia dos erros de tradução

Foi identificada recentemente uma mutação do tipo *missense* no domínio de edição da alanil-tRNA-sintetase (AlaRS) de ratinhos. Esta mutação provoca um defeito parcial na capacidade da enzima de discriminar entre Ala e Ser, dando origem a um alanil-tRNA aminoacilado com serina (Ser-tRNA<sup>Ala</sup>), produzindo ataxia acompanhada de degeneração dos neurónios de Purkinje (Figura 10). Tal é acompanhado pela indução de chaperones moleculares e UPR.<sup>25-28</sup>

Em microrganismos, os erros de tradução não são necessariamente prejudiciais e podem ser influenciados por factores ambientais.<sup>10,29,30</sup>

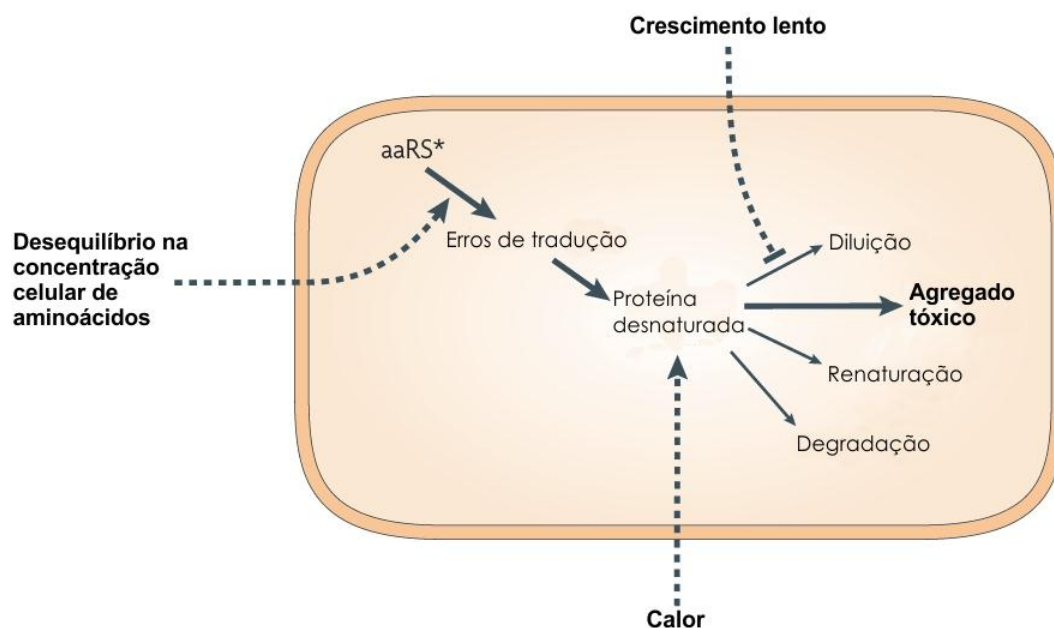
Assim, os mecanismos de controlo de qualidade proteica ganham nova importância, uma vez que são importantes para o equilíbrio celular em situações de flutuações ambientais. Esta hipótese é verificada em microrganismos como *E. coli*, cuja PheRS (fenilalanil-tRNA sintetase) substitui a fenilalanina por tirosina numa frequência de 1-8000, isto é, incorpora erradamente tirosina no lugar da fenilalanina numa em cada 8000 cópias de fenilalanina-tRNA, apesar de manter a sua actividade



**Figura 10 | Perda de células de Purkinje no cerebelo de ratinhos.** Evolução das células cerebrais de ratinhos C57BL/6J nos quais foi induzida a mutação *sti* ao fim de (a) 3 semanas; (b) 6 semanas; (c) 1 ano; (d) Cérebro do ratinho normal (sem mutação).<sup>28</sup>

de controlo de edição de Tyr-tRNA<sup>Phe</sup>.<sup>31</sup> Existem três condições ambientais que potenciam o funcionamento dos mecanismos de controlo de qualidade: 1) desequilíbrio na disponibilidade de aminoácidos livres, devido a limitação de nutrientes; 2) indução da UPR; 3) condições de *stress* que diminuem a taxa de crescimento celular (Figura 11).<sup>13</sup> Por exemplo, em *E. coli* alterações na concentração relativa do aminoácido  $\alpha$ -aminobutirato<sup>32</sup> e leucina podem comprometer a viabilidade celular<sup>33</sup>

Células recombinantes de *S. cerevisiae* que incorporam serina em codões CUG de leucina, aumentam a expressão de proteínas da resposta ao choque térmico e essas células sobrevivem mais tempo a 50°C do que as células controlo, confirmando a indução da resposta ao choque térmico.<sup>34</sup> A observação deste fenótipo mostra-nos que os erros de síntese de proteínas podem ser vantajosos em condições de temperaturas elevadas, conferindo uma vantagem adaptativa em condições ambientais adversas. Todavia, esta modificação diminui a taxa de crescimento a temperaturas próximas da temperatura ótima. Por outro lado, numa estirpe de *E. coli* portadora de uma IleRS defeituosa, aumenta a temperatura ótima de crescimento e mas tem uma taxa de crescimento menor a temperaturas consideradas ótimas para esta bactéria.<sup>13</sup>



**Figura 11 | Condições ambientais que diminuem a aptidão de células defeituosas para realizarem o controlo de qualidade.** Células que expressem uma aminoacil-tRNA sintetase defeituosa ( $aaRS$ , indicado por um asterisco) são sensíveis a factores que actuam sinergicamente com o  $aaRS$  mutante para contribuir para a quantidade de proteínas desnaturadas. Quando a produção destas proteínas excede a capacidade das células para as remover, podem-se formar agregados proteicos tóxicos. (adaptado de Reynolds *et al.*<sup>15</sup>)

No entanto, o efeito mais frequente de uma elevada taxa de erros de tradução é a diminuição da taxa de proliferação<sup>13</sup>

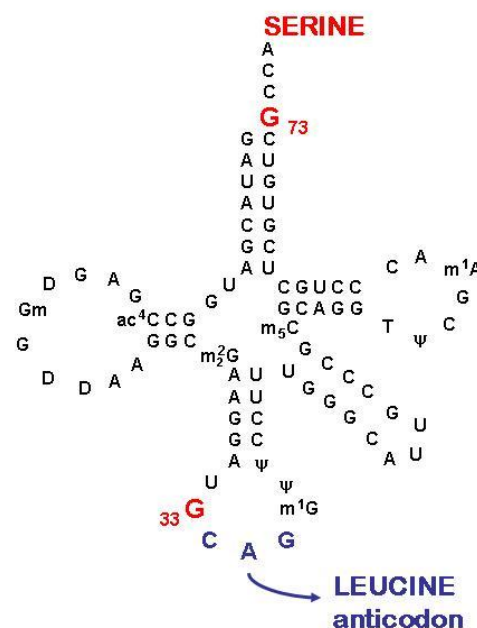
Apesar de todas as consequências negativas que os erros de tradução possam proporcionar, alguns organismos eucarióticos unicelulares conseguem tolerar um alto nível destes erros. Entre elas, algumas espécies do género *Candida* que contêm um  $tRNA_{CAG}^{Ser}$  (tRNA de Serina com anticodão CAG) que é aminoacilado tanto com serina como com leucina, conduzindo a uma decodificação ambígua dos codões CUG (que segundo o código universal genético codifica para leucina).<sup>13,35</sup> Esta ambiguidade deve-se ao facto de o  $tRNA_{CAG}^{Ser}$  ser carregado tanto pela SerRS como pela LeuRS, conduzindo, respectivamente, a uma aminoaciliação correcta Ser- $tRNA_{CAG}^{Ser}$  e a uma aminoaciliação incorrecta Leu- $tRNA_{CAG}^{Ser}$ .

Pensa-se que na origem deste tRNA terá estado a inserção de uma adenosina no intrão do gene do  $tRNA_{CAG}^{Ser}$  tendo esta mutação criado uma molécula de tRNA híbrida contendo uma parte central típica de serina e o anticodão (5'-CAG-3') de um tRNA de leucina (Figura 12)<sup>36,37</sup>. Verifica-se, ainda, neste tRNA, a ocorrência de duas mutações no braço do anticodão, alterando a uridina na



posição 33 (U33) para guanosina (G33) e a adenosina 37 (A37) para guanosina 37. Estas mutações também podem interferir na aminoacilação do tRNA com leucina e diminui a eficiência de descodificação do codão CUG pela tRNA<sub>CAG</sub><sup>Ser 35</sup>.

Tanto a forma Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Ser</sup> como a forma Leu-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Ser</sup> estão disponíveis na célula para a tradução. Sob condições laboratoriais, a serina é incorporada no proteoma de *Candida albicans* com uma eficiência de 97%, e a leucina em 3% dos casos. No entanto, a incorporação da leucina aumenta para cerca de 5% quando este fungo é exposto a condições de *stress*.<sup>38</sup> É de salientar que a *Candida albicans* consegue tolerar cerca de 28% leucina nas posições CUG.<sup>35</sup>



**Figura 12 | Estrutura do tRNA<sub>CAG</sub><sup>Ser</sup> de *Candida albicans*.** A azul apresenta-se o anticódon da leucina e a vermelho os códons que determinam o aminoácido a ser carregado no tRNA.

## 1.6 A levedura como modelo de estudo dos erros da síntese proteica

Apesar do conhecimento sobre os mecanismos de tradução ser cada vez mais vasto, existem muitas perguntas em aberto. De facto, já se sabe que a desnaturação e agregação das proteínas estão associadas a doenças como a fibrose cística ou a amiloidose.<sup>39,40</sup> No entanto, mantém-se o desafio de perceber em que situações as mutações nas proteínas induzem alterações na homeostasia proteica e produzem moléculas não funcionais.<sup>41</sup>

Como tal, existe a necessidade de continuar a investigar estes mecanismos, recorrendo-se ao uso de organismos modelos. A *Saccharomyces cerevisiae* é um excelente modelo experimental, pelo tamanho relativamente pequeno do seu genoma, por este estar completamente sequenciado e a genética ser relativamente simples.<sup>42</sup> Além disso, é um bom modelo de estudo para fenómenos celulares

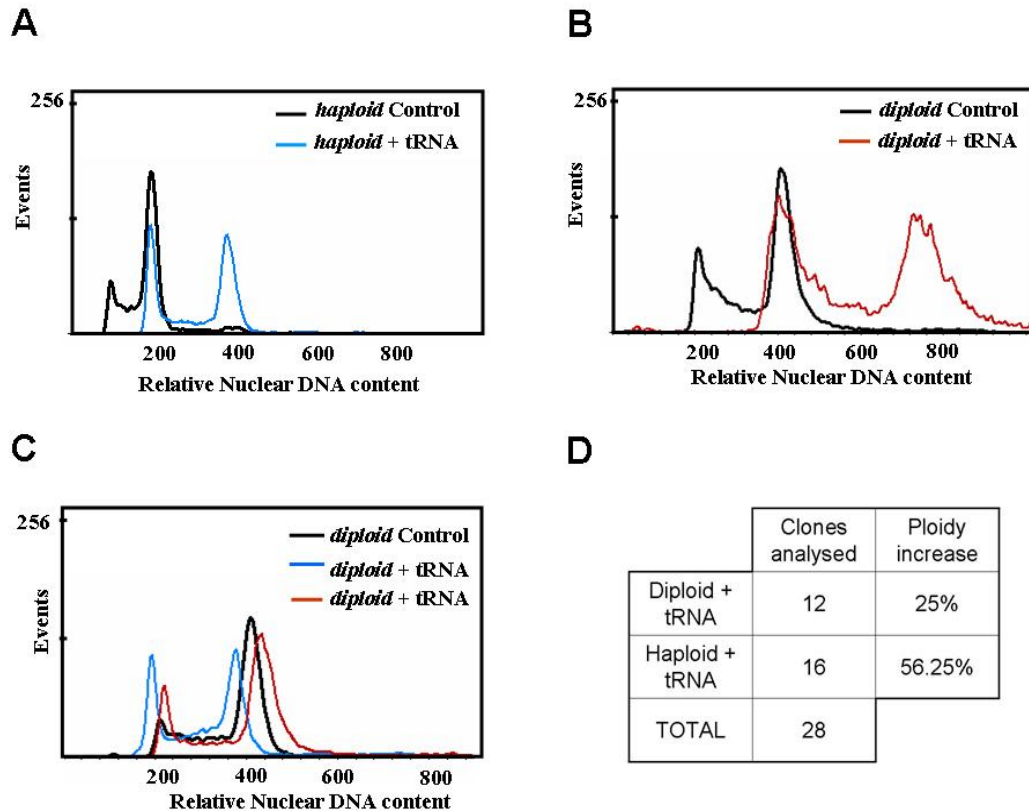
conservados em eucariotas, como é o caso dos mecanismos de controlo de qualidade do proteoma.<sup>41,42</sup>

A introdução do tRNA<sub>CAG</sub><sup>Ser</sup> ambíguo em células de *S. cerevisiae* permitiu obter um sistema celular modelo para estudo do impacto dos erros de tradução em células eucariotas.<sup>43</sup> A inserção deste tRNA não se revelou letal para esta levedura observando-se, no entanto, alterações fenotípicas.<sup>35</sup> A adaptação desta levedura à presença deste tRNA resulta numa extensa alteração da expressão de muitos genes, designadamente de genes responsáveis que codificam chaperones moleculares e proteínas do *stress*, transportadores celulares, manutenção da parede celular e vias metabólicas de aminoácidos e de carboidratos.<sup>35</sup> Também se observa um aumento da ploidia destas células (Figura 13) e alterações morfológicas e fisiológicas importantes, nomeadamente um aumento da concentração intracelular de espécies reactivas de oxigénio, ROS e um consequente aumento da expressão de genes envolvidos na resposta ao *stress* oxidativo.<sup>44</sup>

Espécies reactivas de oxigénio podem ser geradas endogenamente através da fosforilação oxidativa e outras actividades enzimáticas. Certos factores ambientais podem conduzir a um aumento de reacções oxidativas dentro da célula, que poderão resultar num aumento de ROS e, consequentemente, em danos em estruturas celulares (lipídios, proteínas, entre outros), além de perturbar o potencial redox interno. Como tal, a célula eucariota desenvolveu mecanismos de defesa ao *stress* oxidativo de modo a manter o potencial redox interno, gerando moléculas capazes de equilibrar este potencial, como é o caso da tioredoxina e glutaredoxina, e induzindo a acção de diversas enzimas que permitem a desintoxicação de ROS, como é o caso da catalase citosólica.<sup>45</sup>

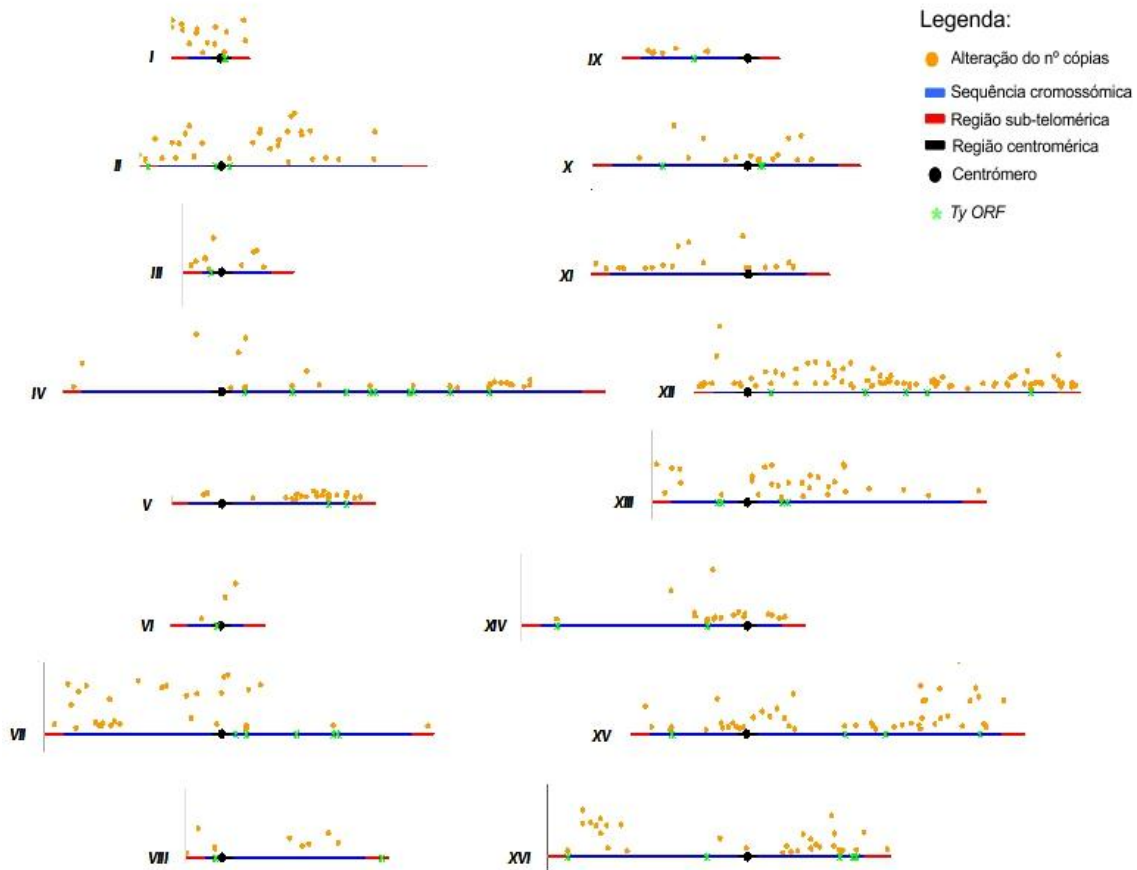
Por outro lado, sabe-se que o *stress* causado pela presença do tRNA<sub>CAG</sub><sup>Ser</sup> e consequente descodificação ambígua do codão CUG, ao induzir o aumento da expressão de muitos genes envolvidos na resposta a diversos tipos de *stresses* ambientais, pré-adapta estas células relativamente a *stresses* adicionais, conferindo-lhes vantagens selectiva importantes.<sup>35</sup>





**Figura 13** | A análise de citometria de fluxo com marcação de DNA com SybrGreen I mostrou que os erros de tradução aumenta a ploidia celular em transformantes haplóides (A) e diplóides (B) e que induzem mudanças discretas no conteúdo de DNA em alguns clones diplóides (C). As evidências de ploidia foram encontradas em 56% dos clones haplóides investigados e em 25% dos clones diplóides investigados (D).<sup>37</sup>

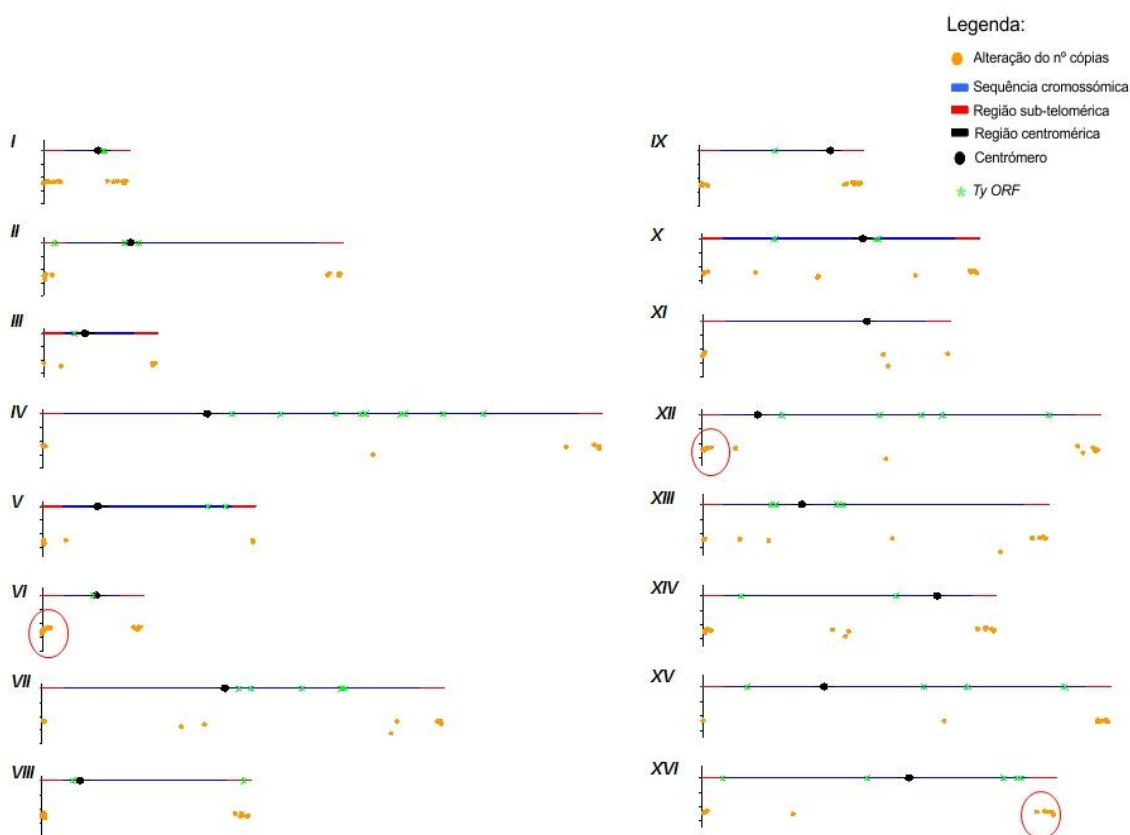
As alterações observadas no conteúdo em DNA genómico na levedura com elevada taxa de erros de tradução é, não só indicativo de alterações de ploidia (Figura 13-A e Figura 13-B) mas também sugere alterações de conteúdo genómico mais discretas (Figura 13-C), compatíveis com eventuais aneuploidias cromossómicas. Com o objectivo de verificar esta última observação, o mesmo modelo de estudo foi sujeito a uma análise comparativa do genoma, usando microarrays de DNA (aCGH). Esta técnica revelou que a elevada taxa de erros de tradução induziu uma frequência elevada de alterações do número de cópias de genes (resultados não publicados), despertando o interesse em aprofundar a caracterização do tipo e extensão da instabilidade genómica observada.



**Figura 14 | Mapa de alterações do número de cópias de genes em leveduras sujeita a elevada taxa de erros de tradução.** Os resultados foram obtidos com a estirpe CEN.PK2 transformada com o tRNA<sub>CAG</sub><sup>Ser</sup> de *C. albicans*, onde se verifica um aumento da taxa de erro de tradução do codão CUG cerca de 240 vezes relativamente à frequência basal. Os pontos laranja representam os resultados da hibridação comparativa do genoma de CEN. PK2 transformada com o tRNA<sub>CAG</sub><sup>Ser</sup> relativamente ao controlo ( $p\text{-value} < 0,05$ ) que se encontram representados em função das coordenadas cromossómicas (cromossomas I a XVI). O afastamento da linha que representa o cromossoma é proporcional ao rácio obtido para a hibridação comparativa. Valores acima da linha indicam aumento da quantidade do DNA (gene) monitorizado. No mapa, salienta-se ainda as regiões sub-teloméricas e centroméricas, bem como as posições de elementos móveis (*Ty-ORFS*) – transposões – no genoma de referência. (dados não publicados)

O estudo efectuado por aCGH revelou que, de facto, as alterações na composição do genoma em leveduras com elevada taxa de erros de tradução se distribuem por vários cromossomas (Figura 14), observando-se um aumento de cópias em mais de 7% dos genes presentes no genoma de CEN.PK2 ( $p\text{-value} < 0,05$ ). A maioria dos genes identificados como alterados possuem funções já conhecidas, estando associados a funções como processamento do mRNA, reparação de danos no DNA, silenciamento da cromatina nos telómeros,

regulação da transcrição, iniciação da tradução, biogénese da parede celular, estabelecimento da polaridade celular, meiose, entre outros.



**Figura 15 | Mapa de alterações do número de cópias de genes em leveduras sujeita a elevada taxa de erros de tradução.** Os resultados foram obtidos com a estirpe BY4742 transformada com o  $\text{tRNA}_{\text{CAG}}^{\text{Ser}}$  de *C. albicans*, onde 3% dos genes sofreram alterações de números de cópia. Os pontos laranja representam os resultados da hibridação comparativa do genoma de BY4742 transformada com o  $\text{tRNA}_{\text{CAG}}^{\text{Ser}}$  relativamente ao controlo ( $p\text{-value} < 0,05$ ) que se encontram representados em função das coordenadas cromossómicas (cromossomas I a XVI). O afastamento da linha que representa o cromossoma é proporcional ao rácio obtido para a hibridação comparativa. Valores acima da linha indicam aumento da quantidade do DNA (gene) monitorizado. No mapa, salienta-se ainda as regiões sub-teloméricas e centroméricas, bem como as posições de elementos móveis (*Ty-ORFS*) – transposões – no genoma de referência. Há uma referência adicional aos cromossomos VI, XII e XVI onde a alteração do número de cópias é mais acentuada nas zonas sub-teloméricas. (dados não publicados)

No entanto, utilizando uma outra estirpe de *S. cerevisiae* (BY4742) observaram-se resultados bastante distintos (Figura 15). Apesar de se confirmar que a introdução do  $\text{tRNA}_{\text{CAG}}^{\text{Ser}}$  induz alterações genómicas, nomeadamente no número de cópias de alguns genes, a distribuição das alterações identificadas foi bastante distinta das descritas na estirpe CEN.PK2. Em BY4742, somente 3% dos genes presentes no genoma da levedura ( $p\text{-value} < 0,05$ ) foram alterados e, ao

contrário do observado para CEN.PK2, os resultados obtidos apontam para uma diminuição do número de cópias desses genes relativamente às células controlo. De notar que 87% dos genes alterados se localizam em regiões sub-teloméricas (Figura 15). Entre estes, salientam-se um grupo de genes que codificam a DNA-helicase, bem como genes envolvidos na resposta a toxinas, tipicamente localizados na região terminal dos cromossomas de levedura.<sup>46</sup>

Os resultados observados nestas duas estirpes indicam não só que o aumento de erros de tradução induz alterações genómicas ao nível de modificação do número de cópias de genes, mas também que estas alterações podem modificar o genótipo da estirpe. Sabendo que a divergência de genomas no género *Sacharomyces cerevisiae* é relativamente reduzida<sup>47</sup>, pressupõem-se que pequenas alterações na composição genómica sejam responsáveis pelas diferenças observadas. Estes resultados despertaram interesse para se alargar este tipo de estudos a outras estirpes de levedura (Tabela 1). A análise dos resultados de

**Tabela 1 | Estirpes de levedura *S. cerevisiae* investigadas no âmbito de estudos de hibridação comparativa de genomas em *microarrays* de DNA (aCGH) para caracterização de padrões de instabilidade genómica causada por elevada taxa de erros de tradução.**

Estirpe	Origem	Genoma
S288c	Lab	sequenciado
BY4742	Lab	-
CEN.PK2	Lab	-
J940047	Clinica	-
YJM789	Clinica	Sequenciado

hibridação comparativa dos genomas das várias estirpes transformadas com tRNA<sub>CAG</sub><sup>Ser</sup> revelou alguns padrões de alterações em regiões cromossómicas específicas, nomeadamente uma elevada frequência de alterações nas regiões sub-teloméricas e no conteúdo relativo de DNA mitocondrial (Tabela 2). Verificou-se que na maioria dos clones mutantes houve uma diminuição do número de cópias em relação ao controlo, com excepção dos clones da estirpe BY4742 e da J940047, em que não se observou em nenhum dos genes uma diminuição de número de cópias. É revelante salientar que uma parte significativa destes genes estão localizados em zonas sub-teloméricas que, como já foi mencionado acima, é uma zona rica em genes de resposta ao *stress*. Assim, surge a hipótese que esta levedura possa ser mais eficaz do que as restantes a combater os vários *stresses* a

que possa ser sujeita. Em contraste, a estirpe YJM789 apresenta maior número de genes com diminuição do número de cópias, verificando-se também que grande parte dos genes estão localizados na zona subtelomérica, sugerindo uma menor capacidade de resposta ao *stress*,

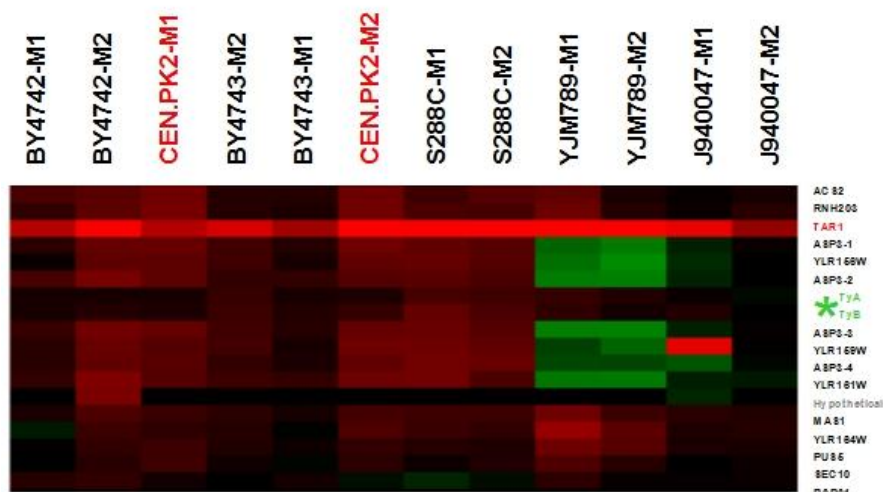
**Tabela 2 | Resumo das alterações de número de cópias de genes observadas por hibridação comparativa do genoma de leveduras sujeitas a elevada taxa de erros de tradução relativamente ao controlo.** Os valores indicam para cada estirpe, o número de genes encontrado em maior ou menor número de cópias (teste de significância para 2 clones independentes com uma taxa de falsas descobertas inferior a 10%). (dados não publicados)

Estirpe	Aumento do nº de cópias	Diminuição do nº de cópias	Localização subtelomérica	Genes mitocondriais
BY4742	30	2	-	27
BY4743	-	9	-	-
S288c	10	111	3	18
CEN.PK2	6	48	12	-
J940047	208	-	186	-
YJM789	29	593	445	-

De apontar, ainda, o número elevado de genes mitocondriais modificados nas estirpes BY4742 e S228c que correspondem, respectivamente, a 96% e 64% dos genes mitocondriais existentes em *Saccharomyces cerevisiae*.

Contudo, nos resultados obtidos, não se encontrou um denominador comum no tipo de genes que foram identificados como variáveis em número de cópia. A excepção a esta regra foi a identificação do gene *TAR1*, localizado no cromossoma XII da levedura, cujo número de cópias parece ter sido aumentado em todas as estirpes testadas (Figura 16). Este gene codifica uma proteína mitocondrial envolvida na regulação do metabolismo respiratório e interage geneticamente com o *RP041* que codifica a RNA polimerase mitocondrial.<sup>48,49</sup>

Pela sua importância na regulação do metabolismo mitocondrial, as alterações do número de cópias do gene *TAR1* nas estirpes com erros de tradução indica que a actividade mitocondrial poderá estar comprometida. De facto, poderá ser esta a causa do aumento de ROS em leveduras com elevada taxas de erros de tradução. Seria interessante estudar se a utilização de compostos conhecidos por neutralizarem os efeitos de ROS intracelular, como o ascorbato ou glutathione,<sup>46</sup> minimizariam os efeitos dos erros de tradução na instabilidade genómica da levedura. De facto, existem evidências experimentais de que a adição de

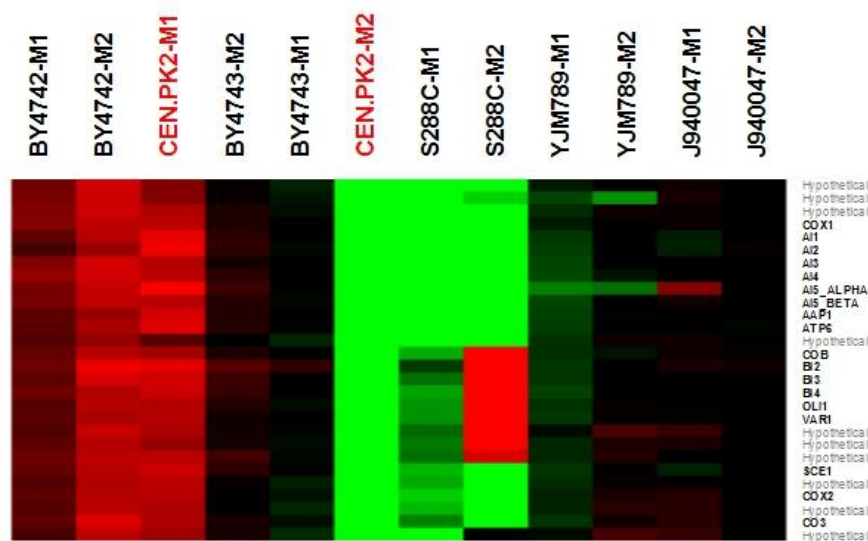


**Figura 16 |** Esquema representativo da alteração do número de cópias dos genes de observadas num segmento cromossoma XII em várias estirpes onde se induziu uma elevada taxa de erros de tradução por introdução do  $\text{tRNA}_{\text{CAG}}^{\text{Ser}}$ . Foram testados dois clones de cada estirpe, designados por M1 e M2, respectivamente. As alterações estão representadas numa escala de cores que varia entre o verde, para diminuição do número de cópias do gene, e o vermelho, representando um aumento do número de cópias do gene relativamente ao controlo. Representa-se a ausência de alteração do número de cópias do gene em relação ao controlo a preto. Nota-se um aumento comum no número de cópias do gene *TAR1*. (dados não publicados)

ascorbato ou glutathione revertem parcialmente o efeito dos erros de tradução na viabilidade celular.<sup>44</sup>

Outro tipo de alterações frequente, mas não comum, foi a variação do conteúdo de DNA mitocondrial nas células com elevada taxa de erros de tradução (Figura 17). Verificou-se uma diminuição do número de cópias dos genes mitocondriais constante nos dois clones da estirpe BY4742 e, surpreendentemente, uma alteração muito diferente do número de cópias do mutante 1 para o mutante 2 da CEN.PK2. Nos dois clones de S288C observa-se uma diminuição semelhante, excepto numa pequena zona mitocondrial. Nas restantes estirpes, a alteração do número de cópias de genes mitocondriais não é observável.

Em resumo, os resultados obtidos no sistema modelo da levedura mostram que os erros de tradução podem causar instabilidade genómica, provocando alterações ao nível do número de cópias de vários genes, alguns dos quais com implicações directas no metabolismo mitocondrial. O aumento de ROS observado nas mesmas células<sup>44</sup> poderá estar relacionado com estas alterações.



**Figura 17 |** Esquema representativo da alteração do número de cópias dos genes de observadas no DNA mitocondrial em várias estirpes onde se induziu uma elevada taxa de erros de tradução por introdução do tRNA<sub>CAG</sub><sup>Ser</sup>. Foram testados dois clones de cada estirpe, designados por M1 e M2, respectivamente. As alterações estão representadas numa escala de cores que varia entre o verde, para diminuição do número de cópias do gene, e o vermelho, representando um aumento do número de cópias do gene relativamente ao controlo. (dados não publicados)

## 1.7 Objectivos do Trabalho

O objectivo desta tese foi investigar a possível existência de uma ligação directa ou indirecta entre a instabilidade genómica, o *stress* oxidativo e os erros de tradução, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo.

### 1.7.1 Testes fenotípicos

De modo a clarificar a relevância biológica dos erros de tradução testou-se a resistência de estirpes ambíguas a vários *stresses* ambientais através da realização de testes fenotípicos. Tais testes surgiram na sequência da observação de alteração do número de cópias de genes subteloméricos nas estirpes J940047 (aumentados) e YJM789 (Diminuídos), região esta onde se encontram muitos dos genes de resposta ao *stress*,<sup>36,37</sup> pretendendo-se determinar se a primeira estirpe é significativamente mais resistente ao *stress* que a última. Nestes testes sujeitaram-se as diversas estirpes a diferentes condições ambientais, testando a sua capacidade de adaptação e sobrevivência. Testaram-se compostos que

induzem a UPR, a resposta osmótica da célula, entre outros. Teve-se o cuidado de escolher testes já utilizados para distinguir estirpes de levedura que induzem alterações fisiologicamente revelantes.<sup>50-52</sup> Testou-se ainda o efeito dos erros de tradução no *stress* oxidativo por citometria de fluxo, usando um fluorocromo específico para este tipo de testes, dihidrorodamina 123.<sup>53</sup> foram planeados testes para determinar se existe algum tipo de relação entre as alterações observadas a nível do conteúdo de DNA mitocondrial e o nível de ROS, avaliando o conteúdo de DNA por citometria de fluxo com iodeto de propídeo.<sup>54</sup>

### **1.7.2 Estudo da expressão genética**

Numa segunda fase do trabalho estudou-se expressão genética através do uso de *microarrays* de DNA. A aplicação desta técnica permite obter um conhecimento alargado sobre a resposta destes organismos ao *stress* proteotóxico e comparar a resposta entre estirpes e clones.





## **2 Material e métodos**

## 2.1 Obtenção e conservação de estirpes

As estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste estudo pertencem à colecção de culturas do laboratório, preservada a -80°C em meio YPD (1% extracto de levedura, 2% peptona, 2% glucose) líquido suplementado com glicerol a 50%. As estirpes foram transformadas com os plasmídeos pUKC715 (G<sub>33</sub> tRNA<sub>CAG</sub><sup>Ser</sup>), sendo estes clones designados como mutantes por terem o tRNA mutante, e pRS315 transformada com o plasmídeo vazio (tabela 3).

**Tabela 3 | Estirpes usadas e designação dos vários clones.**

ESTIRPE-MÃE	ESTIRPES EM ESTUDO		
	CONTROLO	MUTANTE 1	MUTANTE 2
BY4742	B42-C	B42-M1	B42-M2
BY4743	B43-C	B43-M1	B43-M2
CEN.PK2	CEN-C	CEN-M1	CEN-M2
S228c	S-C	S-M1	S-M2
J940047	J-C	J-M1	J-M2
YJM789	Y-C	Y-M1	Y-M2

## 2.2 Testes fenotípicos

Para a realização destes testes, obtiveram-se inóculos descongelando o equivalente a uma ansa de cultura conservada a -80 C em meio YPD líquido contendo 200 µg/ml de geneticina (Gibco, Invitrogen Life Technologies) e incubando a 30°C durante a noite, com rotação de 180 rpm. As culturas para os testes fenotípicos foram realizadas em meio YPD líquido suplementado com geneticina (200 µg/ml) numa O.D.<sub>600</sub> inicial de aproximadamente 0.05. As culturas foram incubadas até a uma O.D.<sub>600</sub> ≈ 0.5 a partir de um inóculo crescido durante a noite, diluídas apropriadamente em meio YPD com geneticina de modo a inocular os meios preparados para os testes fenotípicos. Estes foram realizados em meio YPD + geneticina sólido (com 2% agar) suplementado com o composto a testar, cujas concentrações são indicadas na tabela 4. Foi ainda testado o crescimento destas células em meio mínimo (0.335 MM-AA) e em meio de esporulação (1% Acetato de Potássio, 0.1% Extracto de Levedura, 0.05% Dextrose e 2% Agar). Com o intuito de testar a resistência ao *stress* térmico destas estirpes também se plaquearam células em meio sólido YPD que se incubaram a 37° e 42° durante o mesmo período de tempo.

**Tabela 4 | Lista de compostos utilizados nos testes fenotípicos e respectivas concentrações.**

COMPOSTO	CONCENTRAÇÕES USADAS	REFERÊNCIA
<b>Menadiona</b>	0.5 mM	<i>Gash et al.<sup>50</sup></i>
	1.0 mM	
	1.5 mM	
<b>DTT</b>	2.0 mM	<i>Gash et al.<sup>50</sup></i>
	2.5 mM	
	3.0 mM	
<b>Sorbitol</b>	1.0 M	<i>Gash et al.<sup>50</sup></i>
	2.0 M	
<b>SDS</b>	0.01%	<i>Kvitek et al.<sup>52</sup></i>
	0.02%	
	0.03%	
<b>Etanol</b>	10%	<i>Kvitek et al.<sup>52</sup></i>
	20%	
	30%	
<b>Cafeína</b>	10.0 mM	<i>Kvitek et al.<sup>52</sup></i>
	15.0 mM	
	20.0 mM	
<b>Cloreto de Sódio</b>	1.3M	<i>Kvitek et al.<sup>52</sup></i>
	1.5 M	
<b>Cloreto de Cádmio</b>	50 µM	<i>Kvitek et al.<sup>52</sup></i>
	100.0 µM	
	200.0 µM	
<b>Peróxido de hidrogénio</b>	1.0 mM	<i>Kvitek et al.<sup>52</sup></i>
	1.5 mM	
	2.0 mM	
<b>Cloreto de Lítio</b>	25.0 µM	<i>Kvitek et al.<sup>52</sup></i>
	50.0 µM	
	75.0 µM	
<b>Cloreto de Cálcio</b>	0.5 M	<i>Kvitek et al.<sup>52</sup></i>
	0.8 M	

As culturas de leveduras foram distribuídas em placas de 96 poços nas várias diluições testadas. Com o auxílio de um robot (Sciclone ALH 3000 Workstation (CaliperLifeSciences)) replicaram-se as células para os meios preparados previamente. As culturas foram incubadas numa estufa a 30°C durante 72h.

Para cada teste contabilizou-se a presença ou ausência de crescimento, em cada clone e para cada uma das diluições testadas. O teste foi realizado em triplicado e os resultados dos diversos testes foram comparados entre si. De seguida analisou-se

estatisticamente, usando o programa MeV, aplicando uma correlação de Pearson, com intuito de agrupar perfis com base nas suas semelhanças. Esta análise foi realizada com base na comparação de cada um dos mutantes relativamente ao controlo.

## **2.3 Protocolos de citometria**

As análises citométricas foram realizadas através da utilização do citómetro de fluxo Beckman Coulter® EPICS® XL™, recorrendo às funcionalidades do software FlowJo versão X (© Tree Star, Inc.). Os dados foram interpretados através da criação de gráficos em forma de histograma, cujos parâmetros são específicos conforme o teste em questão.

### **2.3.1 Medição de ROS**

Após descongelamento e preparação de inóculo, as células foram cultivadas em meio YPD + Geneticina líquido até uma O.D.  $\approx 0.3$ . Centrifugaram-se 500  $\mu\text{L}$  destas culturas durante 3 minutos a 13000 rpm, lavando-se, de seguida, com 1 mL de PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Após a lavagem, ressuspendeu-se o sedimento ou *pellet* em 500  $\mu\text{L}$  de PBS e adicionaram-se 7.5  $\mu\text{L}$  de DHR 123 (Sigma Aldrich) numa concentração de 1 mg/mL em etanol, preparada a partir de uma solução stock de 2,5 mg/mL em metanol (proporção solução-etanol de 2:3), incubando a 30° no escuro durante 1h. As amostras foram analisadas de seguida por citometria de fluxo. Procedeu-se de modo semelhante para analisar células em fase estacionária, O.D.<sub>600</sub> > 0.8.

### **2.3.2 Monitorização de ploidia**

Para determinar a ploidia das estirpes em estudo, e após descongelamento e preparação do inóculo, cultivaram-se as células durante a noite em 5 mL YPD + Geneticina, a 30°C e 180 rpm, de modo a obter culturas frescas em fase estacionária. Centrifugou-se 1 mL da cultura e lavou-se o *pellet* com 1 mL de PBS. Seguidamente, procedeu-se à sua fixação em 1 mL de etanol a 70%, incubando durante a noite a 4°C. As células fixadas foram lavadas em 1 mL PBS e ressuspendidas em 700  $\mu\text{L}$  da mesma solução. Em seguida, adicionaram-se 250  $\mu\text{L}$  de solução de RNase A (1

mg/mL) e incubou-se durante 1 hora a 50°C para remover o RNA. Procedeu-se a uma nova incubação com 50 µL de Proteinase K (20 mg/mL) durante 1h a 50°C para remoção de proteína. Para a detecção do DNA por citometria, adicionou-se 50 µL de Iodeto de Propídeo (1 mg/mL), incubando-se as amostras a 6-8°C no escuro, durante a noite. As preparações foram analisadas por citometria de fluxo no prazo de 24h após exposição ao iodeto de propídeo.

## **2.4 Protocolo de Microscopia (marcação do DNA com DAPI)**

Após descongelamento e preparação de inóculo, as células foram cultivadas em meio YPD + Geneticina líquido durante a noite a 30°C em YPD + Geneticina. Retiraram-se 500 µL da cultura de células em fase estacionária e centrifugaram-se as suspensões celulares. De seguida, lavaram-se as células uma vez com 1 mL PBS e ressuspendeu-se o sobrenadante em 10 µL de solução DAPI 0.5 µg/mL. Incubou-se a solução a 37°C durante 10 minutos e, posteriormente lavou-se 2x com 1 mL PBS. Por fim, analisaram-se as células ao microscópio de fluorescência. As imagens foram adquiridas e analisadas no programa AxioVision versão 4.8 (Carl Zeiss).

## **2.5 Protocolo de transformação de *S. cerevisiae***

Cultivaram-se as estirpes a ser transformadas em 10 mL de meio YPD, durante a noite, a 30°C, com agitação. No dia seguinte mediu-se a O.D.<sub>600</sub> da cultura e diluiu-se de modo a ficar uma O.D.<sub>600</sub> = 0.05, usando-se meio fresco para a diluição. Incubou-se então a nova cultura a 30°C, com agitação 200 rpm, até O.D.<sub>600</sub> = 0.4-0.5, certificando-se que as células completavam pelo menos 2 divisões. De seguida, recolheram-se as células por centrifugação a 4000 rpm, 5 minutos, descartando posteriormente o sobrenadante e ressuspendendo as células em 5 mL de água miliQ ultra pura, sem nucleases. Centrifugaram-se novamente as células a 4000 rpm, 5 minutos, eliminando de seguida o sobrenadante. Ressuspendeu-se, então, o *pellet* em 500 µL de Acetato de Lítio 0.1 M (preparada a partir da diluição de solução stock 1.0 M) e distribuíram-se alíquotas de 50 µL de suspensão celular em *ependorfs* de 1.5 mL. Centrifugou-se, de seguida, as células à velocidade máxima numa centrífuga de bancada durante 15 segundos e removeu-se o sobrenadante com uma micropipeta. Usou-se uma solução de *ssDNA* (*carrier DNA*, de esperma de salmão) – 2 mg/mL

fervida durante 5 minutos de modo a desnaturar o DNA, arrefecendo-se em seguida imediatamente em gelo.

Adicionaram-se, então, os seguintes ingredientes, cuidadosamente, sobre o *pellet* celular pela seguinte ordem: 240 µL de PEG (50% p/p), 36 µL Acetato de Lítio 1.0 M, 25 µL ssDNA (2mg/mL) desnaturado e 50 µL DNA para transformação (0.1 – 10 µg solução em água miliQ) ou H<sub>2</sub>O nos controlos negativos. Agitou-se (vortex) em seguida cada um dos tubos até que o *pellet* estivesse completamente ressuspensão na mistura e incubou-se em banho de água a 42° durante 30 minutos. Após a incubação, recolheram-se as células por centrifugação a 5000 rpm durante 1 min e eliminou-se completamente o sobrenadante. Ressuspenderam-se as células em 100-200 µL de água miliQ estéril e plaquearam-se as suspensões em placas com meio selectivo (Geneticina (G418, 200 µg/mL)), incubando-as a 30° durante 3 dias. Por fim, guardou-se o stock de clones transformados a -80°C.

## **2.6 Extracção e preparação do RNA para análise de aCGH**

### **2.6.1 Isolamento de RNA total de *S. cerevisiae***

Ressuspenderam-se as células congeladas em fenolácido:clorofórmio (Sigma, 5:1, pH 4.7 e a 65°C antes do uso), usando 500 µL por 25 unidades de OD (volume da cultura x O.D.<sub>600</sub>) e adicionou-se imediatamente o mesmo volume de tampão TES (10mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS). Agitou-se (vortex) então a mistura durante 20 segundos num ângulo de 20°, de modo a ressuspender o *pellet*. De seguida, incubou-se a solução num banho de água a 65°C, durante 1 hora, agitando a cada 10 minutos, tendo o cuidado de não permitir que os tubos arrefecessem muito. No final da incubação, agitou-se durante 20 segundos e transferiu-se a solução para *ependorfs* de 1.5 mL. Centrifugou-se durante 20 minutos a 14000 rpm, a 4°C. Transferiu-se então a fase aquosa para um novo *ependorf* contendo 600 µL de Fenol:Clorofórmio (5:1, pH 4.7) e agitou-se durante 20 segundos, centrifugando-se em seguida a solução 10 min, a 14000 rpm, 4° C. Transferiu-se novamente a fase aquosa resultante da centrifugação para um novo tubo *ependorf*, desta vez contendo 500 µL de Fenol:Clorofórmio (5:1 pH 4.7), centrifugando-se, também, 10 minutos a 14000 rpm e 4°C. Após a centrifugação, pipetou-se para um novo *ependorf* 500 µL de

Clorofórmio:álcool-isoamilico (24:1) e transferiu-se a fase aquosa para este tubo, agitando durante 20 segundos seguido de uma nova centrifugação de 10 minutos a 14000 rpm a 4°C. Transferiu-se a fase aquosa para um novo *eppendorf*, desta vez este contendo 50 µL de Acetato de Sódio (NaAc, 3 M, pH 5.2) e encheu-se o tubo com Etanol 100% (-20°C). Incubaram-se os tubos a -20°C durante a noite.

No dia seguinte centrifugaram-se os tubos durante 5 minutos a 14000 rpm, temperatura ambiente, removendo o sobrenadante com uma micropipeta (e com o devido cuidado para não tocar no *pellet* de RNA). Lavou-se, então o *pellet* com 500 µL Etanol 80% (-20°C) e fez-se uma centrifugação rápida. Removeu-se, de seguida, todos os traços de Etanol, deixando o tubo sujeito a ar seco durante 1 minuto. Por fim, dissolveu-se o *pellet* de RNA em água miliQ estéril de modo a obter uma concentração final aproximada de 10 µg/mL.

## 2.6.2 Transcrição reversa do RNA

Preparou-se a seguinte mistura em gelo: 3 µL de mRNA, 3 µL de Oligo dT12-18 primer (0.25 µg/mL) e 7 mL de H<sub>2</sub>O. Incubou-se a 70°C durante 10 minutos seguido de uma centrifugação rápida e uma incubação no gelo durante 5 minutos. Paralelamente à incubação a 70°C preparou-se a mistura de marcação adicionando-se a um tubo (1.5 mL) as seguintes proporções de reagentes (adaptou-se as quantidades conforme o número de reacções; a descrita aqui resulta apenas para uma única reacção): 3 µL de dGAC-mix (1 mM), 0.9 µL de DTTP (1 mM), 2.1 µL de aa-dUTP (Sigma, A-0410) (1 mM), 6 µL de 5x *first strand buffer* e 3 µL de DTT, perfazendo um total de 15 µL de solução por reacção. Após a incubação, adicionou-se a mistura de marcação à mistura inicial e incubou-se a nova solução à temperatura ambiente durante 2 minutos. Adicionou-se, então, 2 µL de *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (200 u/µL, Gibco/Life, 1 8064-014) e incubou-se a 42°C durante 60 minutos. Após a síntese do DNA hidrolisou-se o RNA molde incubando a solução a 95°C durante 2 minutos, arrefecendo-a imediatamente a seguir no gelo. Fez-se uma mistura de 10 µL NaOH 1M e 10 µL EDTA 0.5M, adicionando-se em seguida esta mistura à reacção de cDNA e incubou-se a 65°C durante 15 minutos. Após uma breve centrifugação, adicionou-se 25 µL tampão HEPES (1 M, pH 7.5), misturando-o bem. Os nucleótidos livres e outros componentes



da reacção foram removidos usando um concentrador *Microcon-30* (*Amicon Microcon YM-30*, 42410) e 450 µL de H<sub>2</sub>O. Para tal, adicionou-se a reacção neutralizada ao concentrador e centrifugou-se durante 8 minutos a 10000g. Deitou-se fora o líquido excedente depositado no fundo do tubo e repetiu-se o passo duas vezes, voltando a encher o filtro original com 450 µL de H<sub>2</sub>O. Por fim, colocou-se o filtro em posição invertida num novo tubo e centrifugou-se durante 3 minutos a 1000g.

### 2.6.3 Marcação fluorescente de cDNA

Adicionou-se tampão de Bicarbonato de Sódio (0.5 M, pH 9) numa proporção de 1:9 às amostras. Ressuspendeu-se previamente todo o conteúdo do tubo dos corantes fluorescentes monofuncionais *NHS-ester* Cy 3 ou Cy 5 (*Amersham PA 23001* e *25001*) em 10 µL DMSO (*Merck 8.02912.10*) Para armazenamento de amostras, prepararam-se alíquotas de 1.25 µL que se desidrataram por *vacuum* e que foram guardadas a -20°C.

Adicionaram-se as amostras de cDNA aos tubos com os corantes fluorescentes, misturando-as bem e incubando-as no escuro à temperatura ambiente durante 60 minutos. De modo a reduzir o *background* de fluorescência adicionaram-se 4.5 µL de hidroxilamina 4 M (*Sigma Aldrich 46, 780-4*) e incubou-se no escuro a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Os fluoróforos livres foram removidos da amostra de cDNA marcado usando colunas *CHROMA SPIN-30* (*Clontech*).

Após a remoção da coluna *CHROMA SPIN* do plástico protector, inverteu-se diversas vezes até ressuspender a matriz de gel por completo, cortou-se a parte debaixo construída para o efeito e colocou-se a coluna dentro de um tubo de microcentrifuga de 2 mL, retirando a capa superior protectora. De seguida centrifugou-se a 700g durante 5 minutos, descartando-se então o tubo colector e colocando-se a coluna num segundo tubo de microcentrifuga de 2 mL. Aplicou-se então a amostra no centro do gel com os devidos cuidados, centrifugando-se de seguida novamente a 700 g, durante 5 minutos. Removeu-se a coluna, fechou-se o respectivo tubo colector e guardou-se a -20°C no escuro.

## 2.7 Protocolo de hibridação para Arrays de Expressão Genética

### 2.7.1 Pré-hibridação

Preparou-se um tampão de pré-hibridação de 100 mL contendo 4x SSC, 25% formamida (Merck Cat# 1.09684.10), 0.1% SDS e 1% albumina de soro bovino (BSA; Sigma Cat# A-9418). Após a solução ser dissolvida (por agitação), filtrou-se e colocou-se num banho a 42°C, inserida numa *Coplin Jar* de 100 mL. Inseriram-se os slides a ser analisados na *Coplin Jar* e incubou-se a 42°C durante 60 minutos. De seguida, lavaram-se os slides mergulhando-os 5 vezes em ddH<sub>2</sub>O à temperatura ambiente e 5 vezes em isopropanol também à temperatura ambiente. Os slides deixaram-se à temperatura ambiente.

### 2.7.2 Hibridação

Preparou-se um tampão concentrado (2x) de hibridação contendo 50% formamida, 10x SSC e 0.2% SDS, filtrou-se de imediato e colocou-se num banho a 42° para prevenir a precipitação do SDS. Tiraram-se 250 µL do tampão concentrado de hibridação e adicionou-se 5 µL de ADN de esperma de arenque (*Herring Sperm DNA*, 10 µg/µL). Aqueceu-se novamente a solução a 42°C até a sua adição ao resto da amostra.

Combinou-se 250 µL da amostra com 250 µL do tampão concentrado de hibridação e aqueceu-se a 95°C durante 5 minutos. De seguida centrifugou-se a 12000rpm durante 4 minutos. Colocou-se um *LifterSlip* limpo, com o lado de *Teflon* virado para baixo, em cima da área do *array*. Pipetou-se então 500 µL da amostra espalhando-se pelo centro da superfície com cuidado para não se derramar a solução colocando o slide depois por cima. Colocou-se o slide numa câmara de hibridação (*Corning Hybridisation Chamber*, *Corning Cat# 2551*) que foi incubada gentilmente num banho a 42° durante 16-20 horas.

### 2.7.3 Lavagem dos *arrays* hibridados

Removeu-se o slide da câmara de hibridação, tendo o cuidado de não danificar a lamela. Abriram-se os *gaskets* numa *Coplin Jar* com 500 mL de tampão de baixa

concentração (1xSSC e 0.2% SDS), separando-se gentilmente a lâmina do *LifterSlip*, que é reutilizável após lavagem com Etanol 70%. Passou-se então para uma nova *Coplin Jar*, contendo o mesmo tampão e incubou-se 4 minutos com agitação à temperatura ambiente. Os *slides* foram então incubados numa nova *Coplin Jar*, contendo um tampão constituído por 0.1xSSC e 0.2% SDS. Incubou-se novamente a 4 minutos com agitação e finalmente lavaram-se os slides em 500 mL de solução 0.1xSSC, para remover as partículas de SDS, incubando 4 minutos à temperatura ambiente. De seguida, centrifugaram-se os slides a 800 rpm durante 3 minutos e, quando necessário, secaram-se com ar comprimido, sendo analisados de imediato.

#### **2.7.4 Aquisição de imagem e processamento dos dados**

As imagens das hibridações dos *microarrays* hibridados foram obtidas usando o scanner *Agilent G2565AA*. As intensidades das fluorescências foram quantificadas pelo programa *QuantArray v3.0* (PerkinElmer) e recorrendo às funcionalidades do programa *BRB-ArrayTools v3.4.0*, eliminaram-se manualmente os *spots* com defeitos (irregulares e/ou com lixo) e retirou-se o ruído de fundo da imagem. Os valores de M (rácios de intensidade de logaritmo de base 2) foram então normalizados de modo a corrigir as diferenças na eficiência do *labelling* do DNA genómico entre amostras. Os valores de intensidade dos controlos foram corrigidos para um valor de mediana zero e todos os dados foram ajustados de acordo com esta alteração. Foi encontrado uma média entre as experiências com corantes trocados (*dye swaps*) para obter os rácios de intensidade representativos da abundância relativa do transcrito para cada ORF monitorizada.

#### **2.7.5 Análise estatística e enriquecimento funcional dos dados**

O *clustering* hierárquico dos dados normalizados e das amostras foi efectuado usando uma correlação de Pearson, através do programa *TM4 Microarray Software Suite (MeV) 4.3*. O *clustering* dos genes foi realizado usando o *CLICK*, um algoritmo de *clustering* implementado no *EXpression Analyzer and DisplayER (EXPANDER) 4.0.2*, que não requiere suposições prévias para o tipo de estrutura ou número de *clusters* a ser encontrado.

A análise de significância foi feita usando *Significance Analysis for Microarrays (SAM)* também implementado no MeV. A comparação entre a semelhança de expressão genética de cada um dos clones mutantes relativamente ao clone controlo foi realizada usando um teste *two-class unpaired SAM*, com uma taxa de falsas descobertas (FDR, abreviado do inglês *false discovery rate*) inferior a 1%. Realizou-se uma análise SAM para encontrar uma resposta comum a todas as estirpes excepto nos clones CEN-M2, Y-M1 e Y-M2, tanto em genes cuja expressão genética tinha sido induzida, como reprimida. Posteriormente foi adicionada ao gráfico que demonstra esta resposta comum, o comportamento da expressão dos mesmos genes nos clones que se diferenciaram da resposta comum.

A interpretação funcional dos dados foi feita com recurso à base de dados *Saccharomyces Genome Database (SGD)* e o enriquecimento funcional foi realizado usando as funcionalidades do programa EXPANDER 4.0.2.



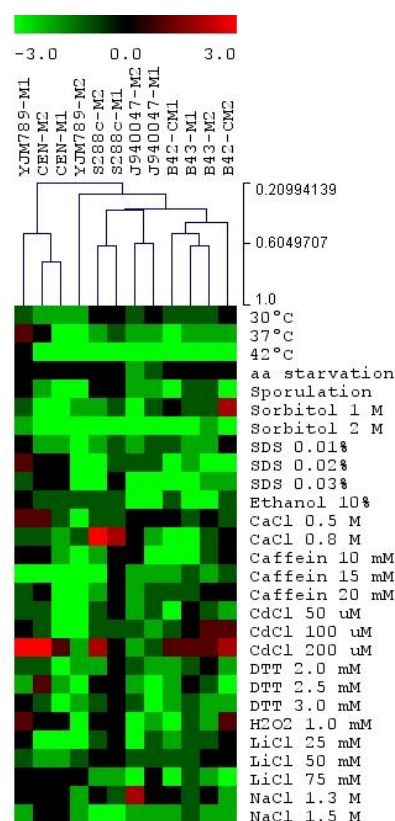
### **3 Resultados**

### 3.1 Nota introdutória

Para a elaboração de todo o trabalho utilizaram-se 6 estirpes de levedura, utilizando no total 18 clones em cada teste. Para cada estirpe, o controlo refere-se à levedura transformada com o plasmídeo pRS315 e as duas células que se apresentam como mutante 1 e mutante 2 foram transformadas com o plasmídeo pUKC715 ( $G_{33}$  tRNA<sub>CAG</sub><sup>Ser</sup>). De modo a facilitar o trabalho e a identificação das espécies, abreviou-se o seu nome (tabela 3, material e métodos). Por exemplo, a estirpe BY4742, recebeu sempre o nome de B42, diferenciando o controlo como C e os mutantes como M1 e M2.

### 3.2 Testes fenotípicos

Os testes fenotípicos foram realizados de modo a testar a resistência destas estirpes a diversos *stresses*, comparando-se as respostas dos mutantes relativamente ao controlo. Pretendia-se, assim, verificar se os erros de tradução resultantes da inserção deste tRNA anómalo conferem à célula uma maior resistência ao *stress*, nomeadamente ao *stress* oxidativo, como sugerido em *Paredes et al.*<sup>43</sup>. Na Figura 18 é possível visualizar a diferença de comportamento entre estirpes, procurando-se agrupar perfis com base nas suas semelhanças, através do uso de uma correlação de *Pearson*. É importante salientar que neste gráfico não estão representados todos os testes em que se verificou ausência de crescimento em todas as espécies (testes com etanol a 20% e 30%, com as várias concentrações de menadiona e com



**Figura 18 | Comparação da resposta das estirpes em estudo aos vários stresses a que foram sujeitos.** Foram comparadas as respostas dos mutantes relativamente ao controlo, sendo só posteriormente sujeitas a uma correlação de *Pearson*. O verde representa uma resposta menos eficaz por parte do mutante em relação ao seu controlo e o vermelho uma resposta mais eficaz do mutante. O preto indica uma ausência de diferença entre mutante e controlo, podendo dever-se a uma ausência de crescimento celular em ambos os clones.

concentrações de peróxido de hidrogénio de 1.5 M e 2.0 M).

A Figura 18 mostra uma diminuição no crescimento dos mutantes em relação ao seu respectivo controlo, com excepção do cloreto de cádmio 200  $\mu\text{M}$ , em que se nota um aumento comum a quase todas as estirpes, e alguns casos pontuais como, por exemplo um aumento de resistência no clone J-M2 ao cloreto de sódio (1.3M). De referir ainda que algumas das diferenças nulas entre controlo e mutante representadas na Figura se devem a um crescimento nulo presente em todos os clones dessa estirpe. Através do agrupamento realizado com esta aproximação matemática, conseguimos ainda visualizar que, em geral, os dois mutantes da mesma estirpe têm respostas semelhantes. A excepção a esta tendência é a estirpe Y, em que o mutante 1 e o mutante 2 se distanciam e a estirpe B42, que devido às suas semelhanças com a B43 (têm um perfil genómico muito semelhante, apenas variando na ploidia, sendo a primeira haplóide e última diplóide) acabam por ter respostas idênticas aos vários tipos de *stress*.

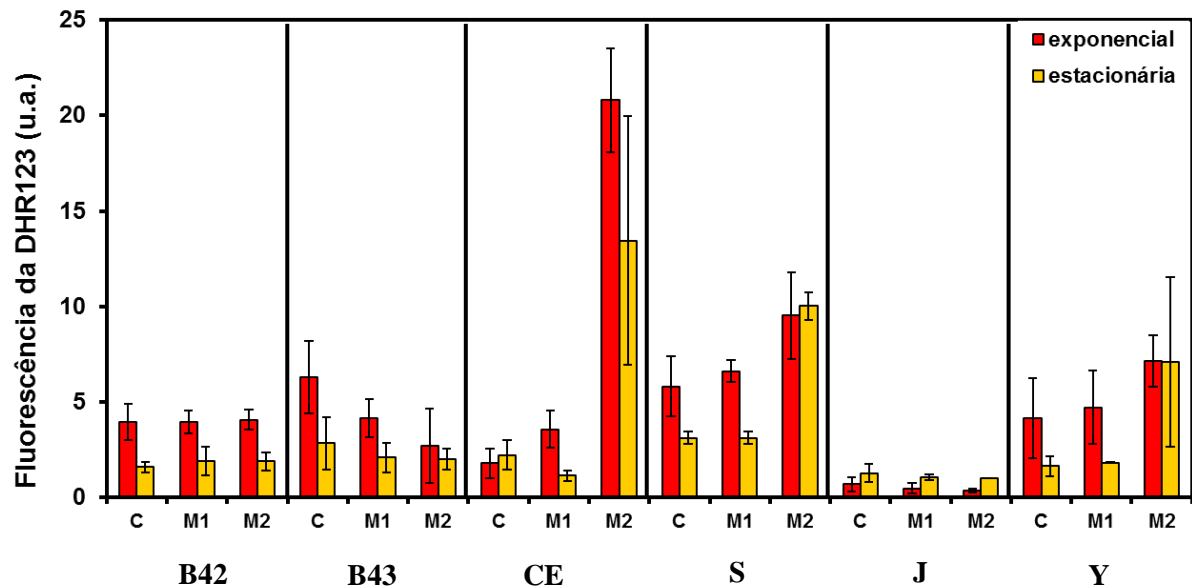
### 3.3 Monitorização do ROS intracelular

Com a finalidade de avaliar o nível de *stress* oxidativo intracelular das estirpes em estudo, realizaram-se testes de citometria com DHR 123 (dihidrorodamina 123). Este composto químico oxida na presença de peróxido de hidrogénio, dando origem a uma rodamina fluorescente, sendo a sua fluorescência passível de ser quantificada. Realizou-se este teste em células em fase exponencial e em fase estacionária, com intuito de avaliar se as eventuais diferenças entre estirpes e clones poderiam ser ainda mais acentuadas em culturas em fase estacionária.

A Figura 19 mostra as diferenças na fluorescência detectada nas fases mencionadas, sendo estes valores representativos da fluorescência média da população de interesse no histograma resultante da análise de citometria com DHR 123. Verifica-se em geral um maior nível de fluorescência na fase exponencial em relação à fase estacionária, sendo excepção a estirpe J. Não se observam diferenças significativas a nível de fluorescência entre controlo e mutantes nas estirpes B42 e J, o que as distinguindo das demais, sendo a B43 a única espécie em que se nota um menor nível de fluorescência nos mutantes do que no controlo. É



bastante notório ainda a diferença do comportamento do clone CEN-M2 em relação aos restantes, verificando-se um nível muito elevado de fluorescência.

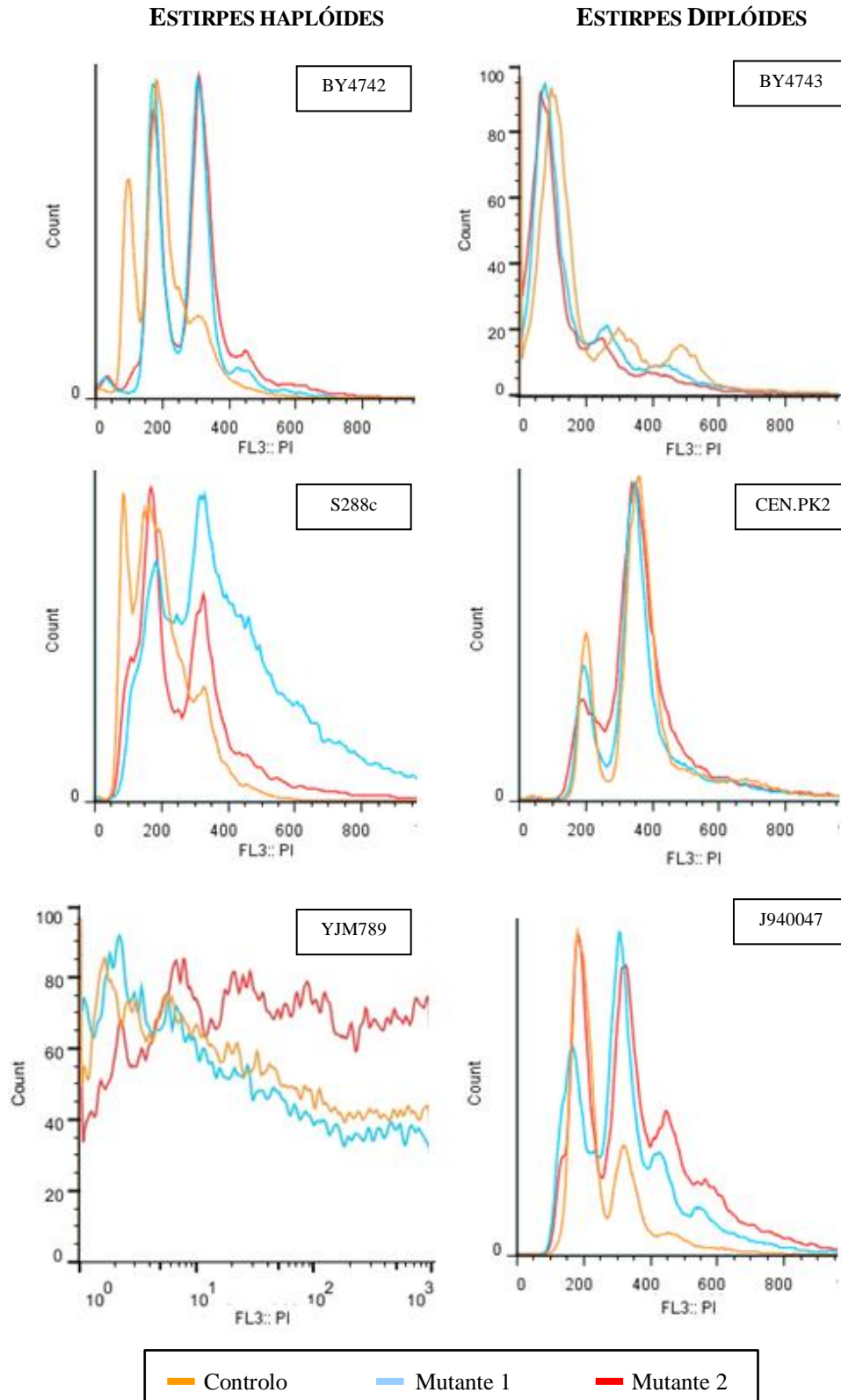


**Figura 19 | Comparação dos níveis de *stress* oxidativo entre várias estirpes de levedura.** Obteve-se a fluorescência média da população de interesse resultante da análise de citometria com DHR 123, estando representado no gráfico a média de 3 ensaios e o desvio padrão associado a esta análise, representado pelas barras de erro.

### 3.4 Ploidia

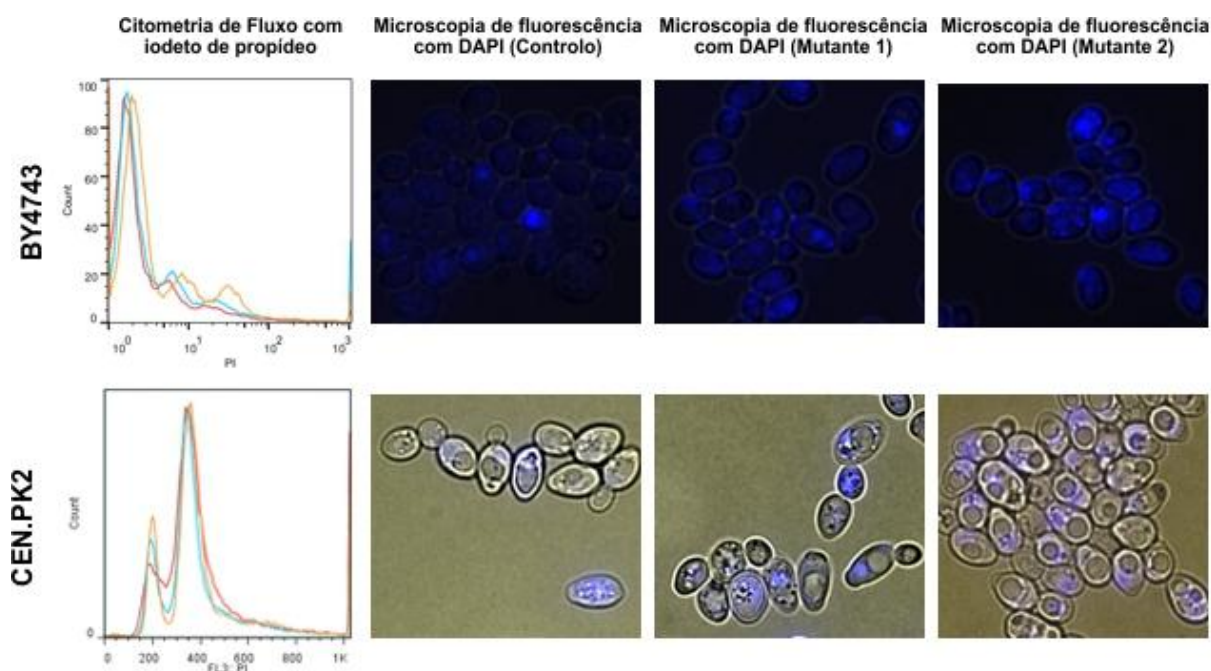
De modo a determinar se os erros de tradução afectam a estabilidade do genoma, determinou-se o conteúdo de DNA de cada estirpe, recorrendo à citometria de fluxo, desta vez com iodeto de propídeo, fluorocromo que se liga à cadeia dupla do DNA.<sup>55</sup> Esta análise baseia-se no princípio de que células expostas a este fluorocromo incorporam uma quantidade do corante proporcional à quantidade de DNA presente na célula.<sup>56</sup> Este teste permite determinar o conteúdo DNA celular mas também identifica as populações de células durante as várias fases do ciclo celular.

A Figura 20 mostra que o conteúdo de DNA das estirpes haplóides mutantes aumentou relativamente ao controlo, contrastando com as estirpes diplóides em que não houve alteração da ploidia. No entanto, pequenos desvios no centro dos picos entre controlo e mutantes, sugerem aneuploidias nos mutantes das estirpes diplóides.



**Figura 20 | Análise de citometria de fluxo com marcação do DNA com iodeto de propídeo.** Esta análise permite saber qual a ploidia da população pois o iodeto de propídeo liga-se à cadeia de DNA. Os gráficos mostram um aumento de ploidia induzido pelos erros de tradução nas estirpes haplóides e aneuploidias nas estirpes diplóides.

Com o intuito de verificar se estas alterações no conteúdo de DNA têm consequências a nível da morfologia nuclear, observaram-se as estirpes coradas com DAPI ao microscópio de fluorescência. Contudo, não se detectaram quaisquer alterações na forma e tamanho dos núcleos.



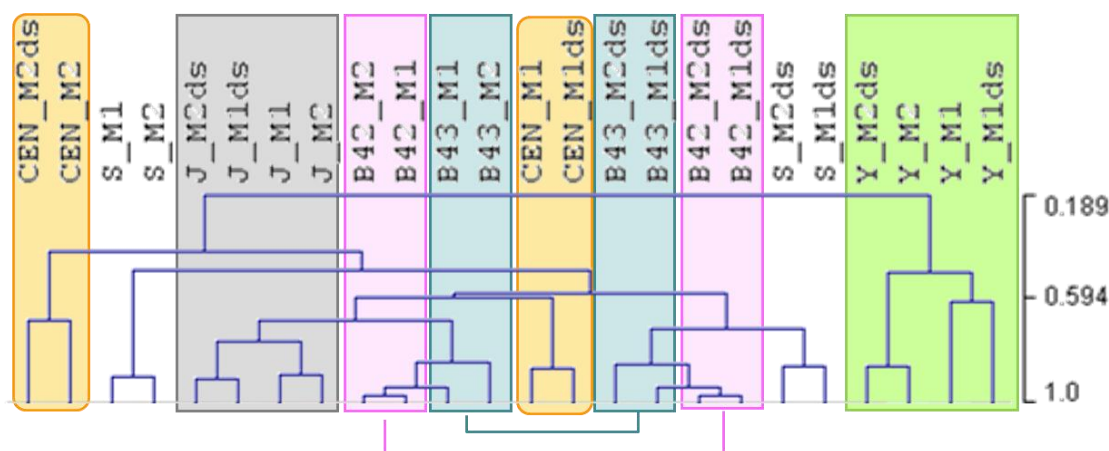
**Figura 21 | Os erros de tradução não alteram a morfologia nuclear da levedura.** Os núcleos foram corados com DAPI e observados por microscopia de fluorescência. Todavia, observaram-se algumas alterações na forma das células ambíguas. São visíveis nestes dois exemplos a alteração do conteúdo de DNA e da forma de célula nas estirpes BYB742 e CEN.PK2, respectivamente.

### 3.5 Arrays de expressão genética

No sentido de elucidar a resposta celular aos erros de tradução, as leveduras controlo e mutantes foram analisadas usando *microarrays* de expressão genética.

Após processamento e tratamento dos dados, procurou-se uma correlação entre as respostas dos mutantes das diferentes estirpes relativamente ao seu controlo de modo a analisar semelhanças intra e inter-estirpes. Assim, procedeu-se ao agrupamento hierárquico dos perfis de expressão genética, relativamente ao seu controlo. O agrupamento obtido por correlação de *Pearson* para os diversos clones (Figura 22) mostra que as estirpes Y e J são as que têm mais semelhança entre mutantes 1 e 2 e a estirpes CEN e S as que apresentam maior discrepância entre mutantes. É importante salientar ainda a parecença entre perfis de expressão genética das estirpes B42 e B43,

o que mostra que estas estirpes respondem de modo muito semelhante aos erros de tradução.



**Figura 22 | Agrupamento hierárquico: correlação de Pearson.** Os perfis de expressão genética dos diversos clones foram comparados com o respectivo controlo e correlacionados entre si. Verifica-se que as estirpes CEN e S são as que apresentam maior discrepância.

Os genes comuns cuja expressão aumentou nas várias estirpes em resposta aos erros de tradução estão envolvidos na resposta ao *stress* osmótico, transporte de hexose e cadeia respiratória (Figura 23, tabela 5). Tal como esperado, observou-se um aumento de expressão dos genes de resposta ao *stress* e enovelamento de proteínas nos mutantes relativamente ao seu controlo em todas as estirpes estudadas.

Foram identificados 1802 genes cuja expressão aumentou ou foi induzida relativamente aos controlos. É interessante verificar que a maior parte dos genes descritos como fazendo parte integrante da ESR (*Environmental Stress Response*) (*Gash et al.*<sup>50,57</sup>) foram identificados como tendo a sua expressão induzida relativamente ao controlo. Estes genes estão relacionados com o sistema de defesa ao *stress* oxidativo, na manutenção e regulação das vias metabólicas intracelulares essenciais à célula, enovelamento de proteínas e sua degradação, etc. De igual forma, genes descritos como sendo alterados pelos erros de tradução em *Silva et al.*<sup>35,58</sup> e *Paredes et al.*<sup>43</sup>, mostraram a mesma tendência nesta análise, podendo-se inferir que esta resposta é comum a estirpes diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* sujeitas a este tipo de erro de tradução. Foi também possível identificar genes cuja expressão é variável entre estirpes, nomeadamente *GPD1*, *GPD2*, *CYC1*, *GSY1*, *GPX2* e *PDR5* e que codificam para componentes dos transposões de leveduras (*YBL005W-A*, *YFL002W-B*, *YOR343W-A*, *YBL101W-A*, *YOR343W*).

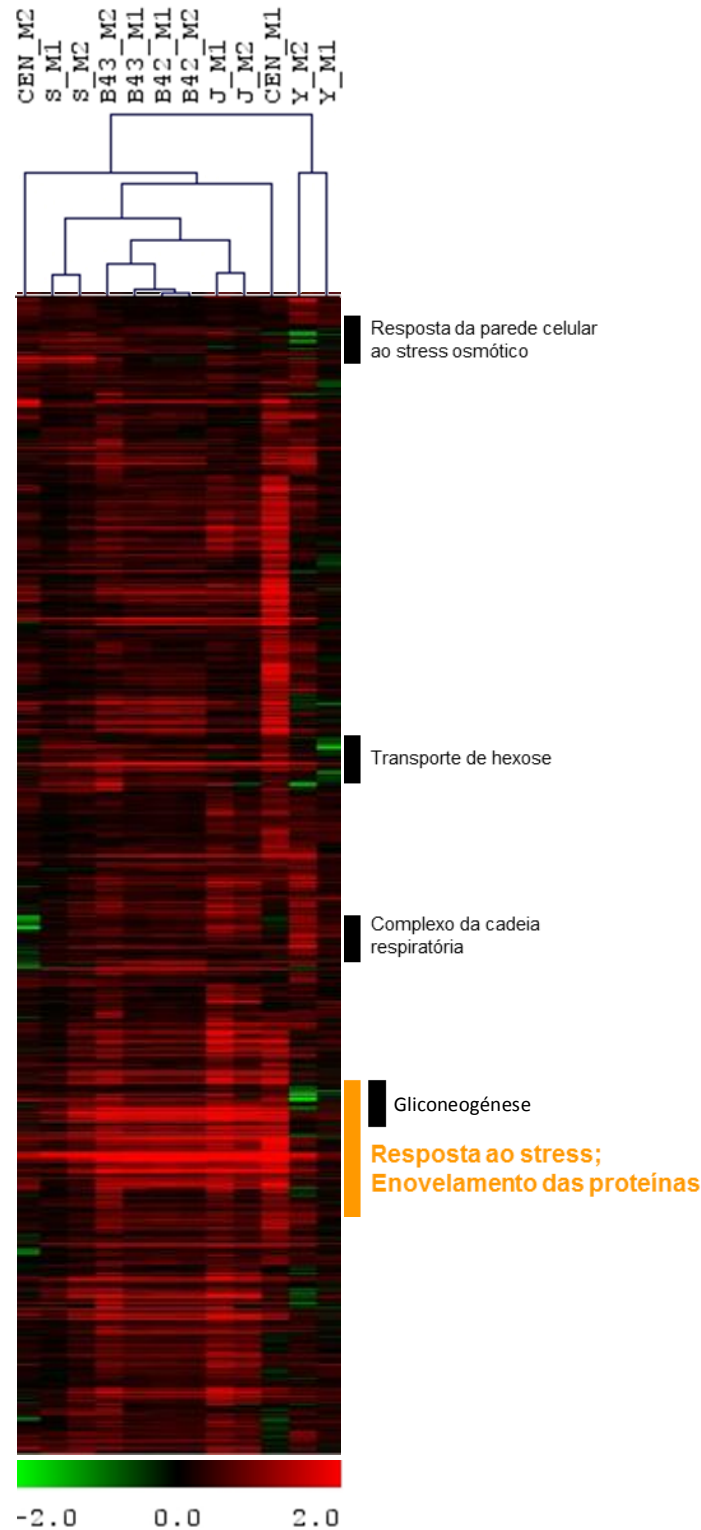
Já no que toca a genes cuja expressão foi reprimida pelos erros de tradução, identificaram-se 1527 genes, sendo importante realçar a diminuição comum da expressão de genes ligados à síntese proteica e transcrição (Figura 24, tabela 6), principalmente dos genes codificantes de proteínas ribossomais.

**Tabela 5 | Genes cuja expressão foi induzida em resposta aos erros de tradução em todas as estirpes estudadas.**

PROCESSO BIOLÓGICO	GENES COM EXPRESSÃO INDUZIDA
Metabolismo dos carboidratos	<i>HXT5</i> <i>HXK1</i> <i>GLK1</i> <i>YDR516</i> <i>XKS1</i>
Degradação de proteínas e funções vacuolares	<i>UBI4</i> <i>PEP4</i> <i>PAI3</i> <i>PRB1</i>
Reparação de danos no DNA	<i>MAG1</i> <i>MMS2</i>
Transporte de hexose	<i>HXT9</i> <i>HXT11</i> <i>HXT3</i> <i>HXT6</i>
Complexo da cadeia respiratória	<i>QCR8</i> <i>COX5B</i> <i>COX7</i> <i>QCR7</i>
Gliconeogénese	<i>ACN9</i> <i>ENO1</i> <i>PCK1</i> <i>TDH3</i>
Enovelamento de proteínas	<i>HSP104</i> <i>HSP42</i> <i>HSP78</i> <i>HSP26</i>
Defesa contra espécies de oxigénio reactivas (ROS)	<i>TRX2</i> <i>TTR1</i> <i>HYR1</i> <i>GPX1</i> <i>CTT1</i>
Resposta comum a diversos tipos de <i>stresses</i>	<i>DDR2</i> <i>HSP42</i> <i>HSP30</i>

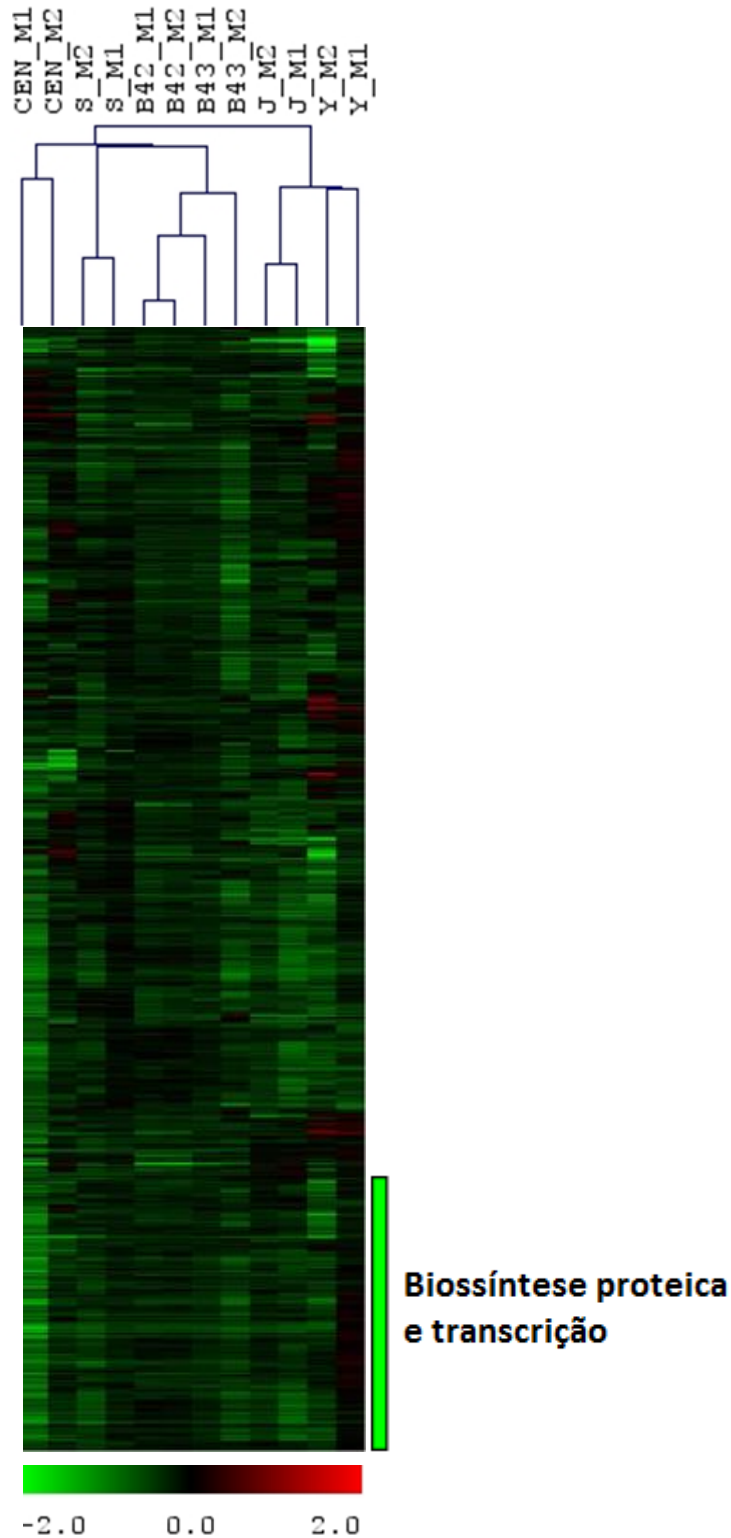
**Tabela 6 | Genes cuja expressão foi reprimida em resposta aos erros de tradução nas estirpes estudadas.**

PROCESSO BIOLÓGICO	GENES COM EXPRESSÃO INDUZIDA
Biossíntese de proteínas	<i>RPP0</i> <i>RPP1A</i> <i>RPP2A</i> <i>RPL30</i> <i>RPS14B</i> <i>SSZ1</i>
Transcrição	<i>CIN5</i> <i>RPC34</i> <i>TFB2</i> <i>RPB10</i> <i>GAL80</i>
Tradução	<i>TEF4</i> <i>CCA1</i> <i>PAB1</i> <i>TIF35</i> <i>GCN1</i>



**Figura 23 | Genes cuja expressão foi induzida em todas as estirpes excepto a CEN-M2 e os mutantes da estirpe Y.** Realizou-se uma análise SAM para todas as estirpes excepto os clones CEN-M2, Y-M1 e Y-M2 e juntou-se a análise SAM feita aos mesmos genes nos clones que não partilhavam a resposta comum. A preto estão anotadas algumas funções dos genes cuja expressão foi diminuída numa destas excepções em relação à resposta comum e a laranja estão anotadas as principais funções dos genes que tiveram uma expressão induzida em praticamente todas as espécies. Todos os resultados aqui apresentados são relativos à comparação entre os mutantes e os respectivos controlos. O vermelho representa aumento de expressão do gene relativamente ao controlo, o verde a inibição e o preto a ausência de diferenças de expressão do gene.





**Figura 24 | Genes cuja expressão foi reprimida pelos erros de tradução em todas as estirpes excepto no CEN-M2 e nos mutantes da estirpe Y.** Realizou-se uma análise SAM para todas as estirpes excepto as mencionadas acima e depois juntou-se a análise SAM feita aos mesmos genes nos clones que não partilhavam resposta comum. Lateralmente estão assinalados genes cuja expressão diminuiu em quase todas as estirpes e estão envolvidos na biossíntese proteica e transcrição. Todos os resultados aqui apresentados são relativos à comparação entre os mutantes e os respectivos controlos. O vermelho representa aumento de expressão do gene relativamente ao controlo, o verde a inibição e o preto a ausência de diferenças de expressão do gene.





## **4 Discussão de resultados**

Os resultados obtidos mostram uma menor resistência das estirpes ambíguas ao *stress* ambiental, sendo a única excepção o cádmio, em que se observou um aumento da resistência das estirpes mutantes. Este aumento de resistência ao cádmio já tinha sido observado anteriormente (*Santos et al.*<sup>59</sup>), tendo sido levantada a hipótese de que estas estirpes mutantes adquiriam maior resistência ao *stress* ambiental. Todavia, estes resultados refutam essa hipótese, deixando a questão da existência de uma resposta diferente em relação a este composto.

Segundo *Gash et al.*<sup>50</sup>, embora haja uma resposta específica da levedura a alterações ambientais, para muitos dos *stresses* testados, existe uma activação de genes comuns que conduzem a uma pré-adaptação a condições ambientais. Só na sequência desta resposta inicial é que é induzida uma alteração da expressão dos genes que é específica de cada tipo de *stress*. Tal é necessário para a adaptação de cada tipo de *stress*. Esta adaptação modifica o metabolismo celular, havendo a intervenção de vários organelos celulares de modo a potenciar a sobrevivência. Os dados obtidos mostram que as células ambíguas não estão pré-adaptadas ao *stress* pois, em geral, são sensíveis ou híper-sensíveis a outros *stresses*, com excepção do cádmio.

Um resultado interessante foi o aumento de ploidia das estirpes haplóides ambíguas. A razão de tal aumento de ploidia não é clara, mas uma possibilidade é que tal aumento diminua a toxicidade do tRNA devido à redução relativa da abundância celular do tRNA ambíguo. Tais alterações de ploidia são importantes porque a poliploidização altera o fenótipo dos organismos de um modo benéfico, afecta o ciclo sexual e produz vantagens selectivas.<sup>60</sup>

Outro resultado interessante foi o aparecimento de aneuploidias, isto é, aparecimento de número não múltiplo exacto do número de cromossomas. Em contraste com a poliploidia, que ocorre frequentemente na natureza e que geralmente, não provoca defeitos graves, a aneuploidia vulgarmente causa letalidade e está associada a doenças, esterilidade e formação de tumores. A aneuploidia pode resultar de uma perda ou ganho de cromossomas, sendo que a primeira afecta mais o funcionamento normal da célula.<sup>61</sup> Curiosamente, as estirpes diplóides não aparentaram alteração de ploidia significativa, embora se coloque a hipótese de existir aneuploidias nos clones mutantes.

A *S. cerevisiae* tende a evoluir no sentido de restaurar o seu estado vegetativo predominante, ou seja regressar ao estado diplóide.<sup>62</sup> Esta evolução pode ocorrer naturalmente, sendo este processo transversal a diversas gerações antes de se atingir este estado de ploidia, ou pode ser resultante de uma adaptação a condições desfavoráveis, sejam elas mutações, alterações de ambiente ou outras.<sup>62</sup> Os resultados obtidos parecem apoiar esta hipótese no caso das estirpes B42 e S, ou seja a duplicação do conteúdo de DNA genómico poderá ter permitido a estes mutantes adaptarem-se aos erros de tradução que lhes foi induzido. Quando se foca a estirpe Y, vemos uma maior taxa de sobrevivência da população poliplóide. Devemos considerar, contudo, que alterações de ploidia e a aneuploidia alteram a expressão genética, podendo explicar alguns dos fenótipos observados. Tais alterações da expressão genética estão associados ao aumento relativo do número de cópia dos genes e isso é dependente do tipo de cromossomas que foram duplicados. Ou seja, as aneuploidias em particular podem produzir alterações significativas dos genes dos cromossomas alterados e fenótipos semelhantes de tais alterações e não de adaptação ao *stress*.

Relativamente à desregulação da expressão génica induzida pelos erros de tradução é de notar um aumento em todas as estirpes da expressão de genes envolvidos no transporte de hexose (*HXT4*, *HXT11*), gliconeogénese (*ENO1*) e da cadeia respiratória (*QCR7*, *AAC1*, *QCR9*, *ATP14*, *ATP4*, *ATP1*).

A *S. cerevisiae* possui 20 genes que codificam proteínas transportadoras de glucose (*HXT1* a *HXT17*, *GAL2*, *SNF3* e *RGT2*)<sup>59</sup> e que aparentam ter afinidades diferentes para a glucose. De facto, já se provou que o organismo apenas expressa os transportadores de glucose apropriados para a quantidade de glucose extracelular disponível, resultante de uma combinação de diferentes mecanismos regulatórios como resposta ao nível de glucose extracelular.<sup>59</sup>

Os resultados obtidos neste trabalho vão de encontro aos publicados por *Gash et al.*<sup>50</sup> que identificou os genes alterados numa resposta inicial a *stresses* ambientais, que denominou de ESR (*Environmental Stress Response*), genes estes que se encontram alterados de forma similar nas estirpes em estudo e que interferem em diversos processos intracelulares, entre os quais o metabolismo dos carboidratos (*HXT5*, *HXK1*, *GKL1*, *YDR516C*, *XKS1*, *PGM2*, *PFK26*); reparo do dano no DNA (*MAG1*, *MMS2*); degradação de proteínas e funções vacuolares (*UBI4*, *UBC8*, *UBC5*,

*UBP15, PRC1, LAP4, PEP4*); reacções redox intracelulares e defesa contra espécies reactivas de oxigénio (*TRX2, TTR1, HYR1, GPX1, CTT1, GTT1, YBL064c*). Este mesmo autor sugeriu que esta resposta era comum a todas as células expostas a uma alteração de ambiente significativa, seguida de uma activação de genes mais específica de acordo com o tipo de *stress* a que o organismo estava a ser sujeito de modo a estabelecer um padrão de expressão genética que lhe conferisse a dinâmica intracelular necessária para obter a melhor taxa de crescimento possível sob as novas condições.<sup>57</sup>

Os resultados mostraram ainda um aumento de expressão comum a quase todas as estirpes de genes que codificam proteínas que estão envolvidas na resposta a *stress* e formação das estruturas terciárias e quaternárias das proteínas, não só envolvidos na ESR mas também mais específicas para o tipo de *stress* provocados pelos erros de tradução. *Paredes et al.*<sup>43</sup> já tinha observado que estes erros de tradução provocavam efeitos sinérgicos na célula, gerando uma resposta adaptativa através da activação de mecanismos de resposta a *stress* tanto exteriores como intracelulares. Um dos dados interessantes deste estudo foi o aumento variável da expressão de genes associados a transposões, sugerindo que os erros de tradução geram a diversidade genómica através da mobilização da actividade dos transposões.

Observou-se também a indução do gene *YAP1*, um factor de transcrição pertencente à família JUN, que activa a expressão de genes que conferem resistência a drogas, *stress* oxidativo e ao cádmio.<sup>63,64</sup> O gene *YAP1* é induzido por agentes que provocam *stress* oxidativo, como é o caso do  $H_2O_2$ .<sup>64,65</sup> Um dos genes induzidos por *YAP1* é o *TRX2*, que codifica a tioredoxina, que é uma proteína que confere maior resistência ao *stress* oxidativo.<sup>64</sup> Assim, o aumento da expressão deste gene explica a maior resistência destes clones mutantes ao cádmio. Por outras palavras, a resposta ao cádmio pode ser indirecta, resultando da resposta ao *stress* oxidativo.

O padrão de repressão da expressão genética é comum a todas as estirpes, dando-se especial ênfase aos genes envolvidos na biossíntese de proteínas e na transcrição. Dos 1527 genes cuja expressão foi reprimida, cerca de 200 genes estão envolvidos nestes dois processos biológicos, sendo que uma grande percentagem dos genes ligados à biossíntese proteica codifica proteínas ribossomais (*RPL9A, RPL9B, RPL30, RPS17A, RPS19B, RPS3*).

A biogénese ribossomal é um dos processos que necessita de mais energia em leveduras, sendo produzidas cerca de 2000 ribossomas por minuto.<sup>66</sup> Assim sendo, existe regulação apertada da biossíntese de ribossomas para evitar o colapso energético da célula. Analogamente, cerca de 60% da transcrição que ocorre dentro da levedura está relacionada com a síntese de RNA ribossomal. Do mesmo modo, 50% da transcrição realizada pela RNA polimerase II e 90% do mRNA *splicing* estão ligados à síntese de proteínas ribossomais<sup>66</sup>, explicando assim a diminuição significativa verificada em genes ligados à transcrição nas estirpes mutantes.

Deve-se salientar que dos genes cuja expressão foi reprimida, encontra-se o *CTA1*. Este gene, que como já foi mencionado antes, codifica a catalase A, que é uma das enzimas que degrada o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não apresenta grandes alterações na expressão no mutante Y-M1 relativamente ao seu controlo e exibe uma diminuição ligeira na maioria das estirpes testadas.



## **5 Conclusão e perspectivas futuras**



Este estudo tinha como principal objectivo tentar estabelecer uma correlação entre os erros de tradução e a instabilidade genómica, pretendendo ver se a resposta era comum entre as diversas estirpes de levedura.

Os testes fenotípicos não foram conclusivos, mas mostraram que os erros de tradução não provocam um aumento de resistência ao *stress* extracelular. A única excepção foi o cádmio. Os testes de expressão genética mostraram a indução comum a todas as estirpes do gene *YAPI* que pode explicar a resposta positiva ao cádmio.

Explorou-se a resposta ao *stress* oxidativo e observou-se uma acumulação de  $H_2O_2$  nas estirpes mutantes relativamente ao controlo, o que indica um aumento do *stress* oxidativo interno e consequente desequilíbrio no balanço redox intracelular.

Em termos de ploidia, observou-se que os erros de tradução aumentam a concentração nuclear de DNA, sugerindo que tais erros produzem populações de células poliplóides e aneuplóides.

Seria interessante num trabalho futuro realizar mais testes de *stress* oxidativo, nomeadamente, testes específicos para a catalase e aprofundar o estudo da resistência ao cádmio.

## **6 Bibliografia**

1. Miko, I. and LeJeune, L., *Essentials of Genetics*, M.N. Education, Editor. 2009, Nature Education: Cambridge.
2. Weaver, R. F., *Molecular Biology*. Second Edition ed. 2002, Lawrence: The McGraw-Hill Companies.
3. Nelson, D. L. and Cox, M. M., *Lehninger - Principles of Biochemistry*. 4th ed. 2004: W. H. Freeman;
4. Clancy, S. and Brown, W., *Translation: DNA to mRNA to protein*. Nature Education, 2008. **1**(1).
5. Ralston, A. and Shaw, K., *Reading the Genetic Code*. Natural Education, 2008. **1**(1).
6. Miranda, I., Silva, R. and Santos, M. A. S., *Evolution of the genetic code in yeasts*. Yeast, 2006. **23**(3): p. 203-213.
7. Jakubowski, H. and Goldman, E., *Editing of errors in selection of amino acids for protein synthesis*. Microbiological Reviews, 1992. **56**(3): p. 412-429.
8. V.R. C., *Genetic code from tRNA point of view*. Journal of Theoretical Biology, 2006. **242**(4): p. 922-934.
9. Goodsell, D. *Aminoacyl-tRNA Synthetases*. 2001; Available from: <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=16>.
10. Schimmel, P., *Mistranslation and its control by tRNA synthetases*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2011. **366**(1580): p. 2965-2971.
11. Kapp, L. D. and Lorsch, J., *The molecular mechanics of eukaryotic translation*. Annu Rev Biochem., 2004(73): p. 657-704.
12. Agris, P. F., Vendeix, F. A. P. and Graham, W. D., *tRNA's Wobble Decoding of the Genome: 40 Years of Modification*. Journal of Molecular Biology, 2007. **366**(1): p. 1-13.
13. Reynolds, N. M., Lazazzera, B. A. and Ibba, M., *Cellular mechanisms that control mistranslation*. Nat Rev Micro, 2010. **8**(12): p. 849-856.
14. *Definition of Missense Mutation*. 2011; Available from: <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=4396>.
15. *Definition of Nonsense mutation*. 2011; Available from: <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=4580>.
16. Krebs, J. E., Goldstein, E. S. and Kilprattick, S. T., *Lewin's Genes X*. 10th ed. 2011, London: Jones and Bartlett Publishers.
17. Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S. and Walter, P., *Functional and Genomic Analyses Reveal an Essential Coordination between the Unfolded Protein Response and ER-Associated Degradation*. Cell, 2000. **101**(3): p. 249-258.
18. Cox, J. S., Shamu, C. E. and Walter, P., *Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase*. Cell, 1993. **73**(6): p. 1197-1206.
19. Morl, K., Ma, W., Gething, M.-J. and Sambrook, J., *A transmembrane protein with a cdc2+ CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus*. Cell, 1993. **74**(4): p. 743-756.
20. McCracken, A. A. and Brodsky, J. L., *Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP*. J Cell Biol., 1996. **132**(3): p. 291-298.

21. Ward, C. L., Omura, S. and Kopito, R. R., *Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway*. Cell, 1995. **83**(1): p. 121-127.
22. Davidson, M. W., *Ribosomes*. Molecular Expressions, 2010.
23. Davidson, M. W., *The Endoplasmic Reticulum*. Molecular Expressions, 2004.
24. Snustad, P., Simmons, M. J. and Jenkins, J. B., *Principles of Genetics*. 1997, New York: John Wiley & Sons, Inc.
25. Gebauer, F. and Hentze, M. W., *Molecular mechanisms of translational control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 827-835.
26. Nangle, L. A., Motta, C. M. and Schimmel, P., *Global Effects of Mistranslation from an Editing Defect in Mammalian Cells*. Chemistry & Biology, 2006. **13**(10): p. 1091-1100.
27. Scheper, G. C., van der Knaap, M. S. and Proud, C. G., *Translation matters: protein synthesis defects in inherited disease*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(9): p. 711-723.
28. Lee, J. W., Beebe, K., Nangle, L. A., Jang, J., Longo-Guess, C. M., Cook, S. A., Davisson, M. T., Sundberg, J. P., Schimmel, P. and Ackerman, S. L., *Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration*. Nature, 2006. **443**(7107): p. 50-55.
29. Holland, S., Lodwig, E., Sideri, T., Reader, T., Clarke, I., Gkargkas, K., Hoyle, D. C., Delneri, D., Oliver, S. G. and Avery, S. V., *Application of the comprehensive set of heterozygous yeast deletion mutants to elucidate the molecular basis of cellular chromium toxicity*. Genome Biol., 2007. **8**(12): p. R268.
30. Parker, J. and Precup, J., *Mistranslation during phenylalanine starvation*. Mol Gen Genet., 1986. **204**(1): p. 70-74.
31. Ling, J., Roy, H. and Ibba, M., *Mechanism of tRNA-dependent editing in translational quality control*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(1): p. 72-77.
32. Nangle, L. A., de Crécy Lagard, V., Döring, V. and Schimmel, P., *Genetic Code Ambiguity*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(48): p. 45729-45733.
33. Karkhanis, V. A., Boniecki, M. T., Poruri, K. and Martinis, S. A., *A Viable Amino Acid Editing Activity in the Leucyl-tRNA Synthetase CP1-splicing Domain Is Not Required in the Yeast Mitochondria*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(44): p. 33217-33225.
34. Santos, M. A., Perreau, V. M. and Tuite, M. F., *Transfer RNA structural change is a key element in the reassignment of the CUG codon in Candida albicans*. EMBO J, 1996. **15**(18): p. 5060-5068.
35. Silva, R. M., Paredes, J. A., Moura, G. R., Manadas, B., Lima-Costa, T., Rocha, R., Miranda, I., Gomes, A. C., Koerkamp, M. J. G., Perrot, M., Holstege, F. C. P., Boucherie, H. and Santos, M. A. S., *Critical roles for a genetic code alteration in the evolution of the genus Candida*. EMBO J, 2007. **26**(21): p. 4555-4565.
36. Smith, J. J., Miller, L. R., Kreisberg, R., Vazquez, L., Wan, Y. and Aitchison, J. D., *Environment-responsive transcription factors bind subtelomeric elements and regulate gene silencing*. Mol Syst Biol, 2011. **7**.

37. Ai, W., Bertram, P. G., Tsang, C. K., Chan, T.-F. and Zheng, X. F. S., *Regulation of Subtelomeric Silencing during Stress Response*. Molecular Cell, 2002. **10**(6): p. 1295-1305.
38. Moura, G. R., Carreto, L. C. and Santos, M. A. S., *Genetic code ambiguity: an unexpected source of proteome innovation and phenotypic diversity*. Current Opinion in Microbiology, 2009. **12**(6): p. 631-637.
39. Chiti, F. and Dobson, C. M., *Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease*. Annual Review of Biochemistry, 2006. **75**: p. 333-366.
40. Perutz, M. F., *Glutamine repeats and neurodegenerative diseases: molecular aspects*. Trends in biochemical sciences, 1999. **24**(2): p. 58-63.
41. Morimoto, R. I., *Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging*. Genes & Development, 2008. **22**(11): p. 1427-1438.
42. Snyder, M. and Gallagher, J. E. G., *Systems biology from a yeast omics perspective*. FEBS letters, 2009. **583**(24): p. 3895-3899.
43. Paredes, J., Carreto, L., Simoes, J., Bezerra, A., Gomes, A., Santamaria, R., Kapushesky, M., Moura, G. and Santos, M., *Low level genome mistranslations deregulate the transcriptome and translome and generate proteotoxic stress in yeast*. BMC Biology, 2012. **10**(1): p. 55.
44. Paredes, J. A., Carreto, L. C., Lima-Costa, T., Gomes, A. C., Ludovico, P., Santamaria, R., Kapushesky, M., Moura, G. R. and Santos, M. A., *Genome translation infidelities unveil cellular signatures of proteotoxic stress in yeast*. Genome Biology, 2012. **(submitted for publication)**.
45. Hohmann, S. and Mager, W. H., *Yeast Stress Responses*. 1997: Springer.
46. Foyer, C. H. and Noctor, G., *Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub*. Plant Physiology, 2011. **155**(1): p. 2-18.
47. Liti, G., Carter, D. M., Moses, A. M., Warringer, J., Parts, L., James, S. A., Davey, R. P., Roberts, I. N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I. J., Bergman, C. M., Bensasson, D., O'Kelly, M. J. T., van Oudenaarden, A., Barton, D. B. H., Bailes, E., Nguyen, A. N., Jones, M., Quail, M. A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R. and Louis, E. J., *Population genomics of domestic and wild yeasts*. Nature, 2009. **458**(7236): p. 337-341.
48. Coelho, P. S. R., Bryan, A. C., Kumar, A., Shadel, G. S. and Snyder, M., *A novel mitochondrial protein, Tar1p, is encoded on the antisense strand of the nuclear 25S rDNA*. Genes & Development, 2002. **16**(21): p. 2755-2760.
49. Bonawitz, N. D., Chatenay-Lapointe, M., Wearn, C. M. and Shadel, G. S., *Expression of the rDNA-encoded mitochondrial protein Tar1p is stringently controlled and responds differentially to mitochondrial respiratory demand and dysfunction*. Curr Genet., 2008. **54**(2): p. 83-94.
50. Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D. and Brown, P. O., *Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes*. Molecular Biology of the Cell, 2000. **11**(12): p. 4241-4257.
51. Bobrowicz, P., Wysocki, R., Owsianik, G., Goffeau, A. and Ułaszewski, S., *Isolation of Three Contiguous Genes, ACR1, ACR2 and ACR3, Involved in Resistance to Arsenic Compounds in the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1997. **13**(9): p. 819-828.

52. Kvitek, D. J., Will, J. L. and Gasch, A. P., *Variations in Stress Sensitivity and Genomic Expression in Diverse S. cerevisiae Isolates*. PLoS Genet, 2008. **4**(10): p. e1000223.
53. Belinha, I., Amorim, M. A., Rodrigues, P., de Freitas, V., Moradas-Ferreira, P., Mateus, N. and Costa, V., *Quercetin Increases Oxidative Stress Resistance and Longevity in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(6): p. 2446-2451.
54. Nunez, R., *DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry*. Curr Issues Mol Biol, 2001. **3**(3): p. 67-70.
55. Lepecq, J. B. and Paoletti, C., *A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: Physical—Chemical characterization*. Journal of Molecular Biology, 1967. **27**(1): p. 87-106.
56. Nunez, R., *DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry*. Curr Issues Mol Biol, 2001. **3**(3): p. 67-70.
57. Gasch, A. P., *The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses*. Current Genetics, 2002. **1**: p. 11-70.
58. Silva, R. M., Duarte, I. C., Paredes, J. A., Lima-Costa, T., Perrot, M., Boucherie, H., Goodfellow, B. J., Gomes, A. C., Mateus, D. D., Moura, G. R. and Santos, M. A., *The yeast PNC1 longevity gene is up-regulated by mRNA mistranslation*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5212.
59. Santos, M. A. S., Cheesman, C., Costa, V., Moradas-Ferreira, P. and Tuite, M. F., *Selective advantages created by codon ambiguity allowed for the evolution of an alternative genetic code in Candida spp.* Molecular Microbiology, 1999. **31**(3): p. 937-947.
60. Comai, L., *The advantages and disadvantages of being polyploid*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(11): p. 836-846.
61. Torres, E. M., Williams, B. R. and Amon, A., *Aneuploidy: Cells Losing Their Balance*. Genetics, 2008. **179**(2): p. 737-746.
62. Gerstein, A. C., Chun, H.-J. E., Grant, A. and Otto, S. P., *Genomic Convergence toward Diploidy in Saccharomyces cerevisiae*. PLoS Genet, 2006. **2**(9): p. e145.
63. Hertle, K., Haase, E. and Brendel, M., *The SNQ3 gene of Saccharomyces cerevisiae confers hyper-resistance to several functionally unrelated chemicals*. Current Genetics, 1991. **19**(6): p. 429-433.
64. Kuge, S. and Jones, N., *YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of Saccharomyces cerevisiae to oxidative stress by hydroperoxides*. EMBO J, 1994. **13**(3): p. 655-664.
65. Hirata, D., Yano, K. and Miyakawa, T., *Stress-induced transcriptional activation mediated by YAP1 and YAP2 genes that encode the Jun family of transcriptional activators in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and General Genetics MGG, 1994. **242**(3): p. 250-256.
66. Dekel, E. and Alon, U., *Optimality and evolutionary tuning of the expression level of a protein*. Nature, 2005. **436**: p. 588-592.